As "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" têm por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos das Ciências Biológicas, Médicas e Químicas, elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros.

São publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores.

The "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" are the vehicle of communication for original papers written by national and foreign specialists who contribute to the progress of Biological, Medical and Chemical Sciences.

They are published under the direction of the Editorial Board which assumes no responsibility for statements and opinions advanced by contributors.

Indexado/Indexed: Biosis Data Base, Chemical Abstract, Current Contents, Index Medicus.

Periodicidade: irregular
Permuta/Exchange: são feitas entre entidades governamentais, com publicações congêneres, mediante consulta prévia. Exchanges with similar publications can be settled with academic and governmental institutions through prior mutual agreement.

Endereço/Address. Instituto Butantan — Biblioteca. Av. Vital Brasil, 1.500
05504 — São Paulo, SP — Brasil
Telefone/Telephone: (011) 813-7222 — R. 129 — Telex: (011) 83325 BUTA-BR
Telefax: (011) 815-1505

Mem. Inst. Butantan
51 (1), 1989.

SUMÁRIO/CONTENTS

Mem. Inst. Butantan
51(1):5-13, 1989

PREPARAÇÃO E TESTE DA TOXINA BOTULÍNICA TIPO "E" E DO SEU ANTI-SORO ESPECÍFICO

Hisako Gondo HIGASHI*
Edison Paulo Tavares de OLIVEIRA*
Raymundo ROLIM ROSA
Maria Antonieta da SILVA*
Fernando FRATELLI*
Naomi ENOKI*
Hideyo IIZUKA*

RESUMO: Os autores descrevem o método utilizado na preparação do soro antibotulínico tipo E, que não apresenta reação cruzada com a toxina heteróloga, pela hiperimunização de eqüídeos, através do antígeno adsorvido pelo alúmen de potássio (sulfato duplo de alumínio e potássio). Empregando o esquema de imunização anteriormente proposto, conseguiram obter mistura de plasma hiperimunes o qual, após purificado pelo método de Pope, modificado, concentrou até níveis na ordem de 750 a 1.000 UI/ml. Este produto foi diluído convenientemente para que contivesse 500 UI/ml de antitoxina.

UNITERMOS: Botulismo; *Clostridium botulinum* tipo E, intoxicação alimentar, toxina e anatoxina, antitoxina.

INTRODUÇÃO

O botulismo é uma intoxicação fatal que pode acometer os homens e os animais, causada pela ingestão de alimentos contaminados por diferentes cepas de *Clostridium botulinum*[3,4,6,7,8,9,11] onde liberam toxinas potentes que, eletivamente, agridem os tecidos do sistema nervoso central (SNC). Após a penetração das toxinas nas células do SNC, dificilmente elas são neutralizadas pelos anticorpos. Convém ainda ressaltar que não se estabelece imunidade cruzada entre as diferentes toxinas. Como a cura do botulismo, até o momento, somente pode ser obtida pela aplicação de soros hiperimunes específicos e, face ao exposto acima, o êxito da soroterapia reside na utilização do sorotipo — específico e na precocidade de sua aplicação ou, em outras.palavras, o soro deve ser aplicado antes da penetração das toxinas nas células nervosas.

A partir de 1972 o Instituto Butantan começou a produzir o soro antibotulínico tipo A[19] e, posteriormente, o tipo B[15]. Devido à especificidade das antitoxinas[18] e a eficácia do seu emprego depender de diagnóstico labora-

* Instituto Butantan — Av. Vital Brasil, 1500 CEP 05504 — São Paulo — Brasil.

Recebido para a publicação em 15-6-1988 e aceito em 4-10-88.

HIGASHI, H.G.; OLIVEIRA, E.P.T. de; ROLIM ROSA, R.; SILVA, M.A. da; FRATELLI, F.; ENOKI, N.; IIZUKA, H. Preparação e teste da toxina botulinica tipo "E" e do seu anti-soro específico. **Mem. Inst. Butantan, 51** (1):5-13, 1989.

torial que demanda tempo, incompatível com a evolução clínica do paciente em nosso meio, foi introduzida a preparação do soro bivalente A e B.

Em face do isolamento de um novo tipo de toxina [14,17], denominada como tipo E e do surgimento de diversos casos de intoxicação humana em diferentes países [11,12] pelo consumo de pescados contaminados com este tipo de toxina e, ainda, pela crescente utilização do peixe e seus derivados enlatados, no Brasil, propusemo-nos a preparar o soro antibotulínico tipo E que é o objetivo do presente trabalho.

É importante ressaltar também a possibilidade de produção do soro tipo ABE.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 — Cepas utilizadas

1.1 — Exame e caracterização

Para a obtenção da toxina tipo E adequada à produção de soros foi necessária a seleção de cepas mais toxigênicas.

Este trabalho foi desenvolvido entre dez amostras a saber:

- amostra nº 63 IP, existente na Germotecá do Instituto Butantan, recebida do Instituto Pasteur, Paris, enviada pelo Prof. A. R. Prevot em 1962.
- amostras 1E, 2E, 38E, 42E, 44E e 48E cedidas pelo Instituto Tecnológico de Alimentos de Campinas (ITAL); São Paulo — Brasil*.
- cepa liofilizada de Nanaimo, recebida do Microbiological Research Establishment, Porton Down Salisbury, Weltshire England**.
- cepa liofilizada EK e EKX, recebida da World Health Organization — Department of Biological Standardization — Copenhagen-Denmark.

Todas as amostras foram examinadas e encontradas satisfatórias quanto à pureza, por repicagem em meio de TPGY[10] e incubadas durante 48h a 30°C em anaerobiose.

Quando semeadas em meio de agar-sangue, apresentam colônias translúcidas, com um diâmetro em torno de 0,5 milímetro após 48h de incubação a 37°C, podendo evidenciar uma discreta reação de hemólise[1]. Em meio de cultura contendo gema de ovo, as colônias são irregulares exibindo uma superfície iridiscente quando examinada sob luz oblíqua. Esta zona lustrosa é também denominada camada aperolada (pearly layer), apresentam uma zona de precipitação maior do que aquelas das colônias do tipo A e cepas proteolíticas do tipo B e F, medindo de 2,0 a 4,0 milímetros circundando-as[24]. A gelatina é hidrolisada, são capazes de provocar, uma suave coagulação do leite, o qual no entanto não é digerido[22]. Finalmente, a produção de gás sulfídrico não é evidenciada, o que é característico ao grupo a qual o C. *botulinum* tipo E pertence[16,22,23].

2 — Obtenção de toxina

2.1 — Meios de cultura utilizados

Os seguintes meios foram utilizados em nossas experiências:

- meio de Müller modificado por Lathan
- meio de TPGY[10]

* — Por gentileza da Dra. Ivone Delazari — Pesquisadora do ITAL.
** — Por gentileza do Dr. J. Bawmer — Canadá.

HIGASHI, H.G.; OLIVEIRA, E.P.T. de; ROLIM ROSA, R.; SILVA, M.A. da; FRATELLI, F.; ENOKI, N.; IIZUKA, H. Preparação e teste da toxina botulínica tipo "E" e do seu anti-soro específico. **Mem. Inst. Butantan, 51** (1):5-13, 1989.

— meio de Duff modificado[12]

2.2 — Preparação do "inoculum"

As cepas liofilizadas eram ressuspensas com 2ml do meio a ser utilizado e semeadas em 20ml do mesmo meio. Os tubos, após 48 horas de incubação a 30°C em jarras anaeróbicas (sistema Gas-pack — BBL em atmosfera de CO_2 e H_2), eram repicados cinco vezes sucessivamente, nas mesmas condições mencionadas. O material total da 5ª passagem, após 24 horas de incubação, era utilizado como inóculo para produção de dois litros de toxina após 6 dias de incubação a 30°C. O pH dos meios era = 7,0, e o volume contido no balão era de 3/4 do volume total do Erlemmeyer. Durante o período de incubação havia formação de gases que eram expulsos por agitação.

3 — Provas efetuadas

3.1 — Prova de pureza: — exame microscópico de cultura em lâminas coradas pelo método de Gram apresentavam forma de bastonetes gram positivos, com bordas arredondadas isoladas ou aos pares e com algumas formas esporuladas subterminais.

3.2 — Titulação da Toxina:

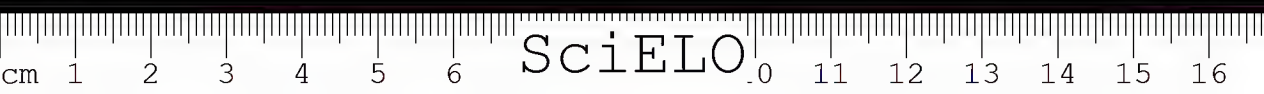
3.2.1 — Tripsinização do material

Após a inoculação nas condições anteriormente mencionadas, removia-se assepticamente 5ml do sobrenadante da cultura com evidência de crescimento, que eram centrifugados a 15.000rpm a 4°C durante 20 minutos. Após a centrifugação 2ml do sobrenadante eram colocados em tubos de ensaio, e o pH acertado para 6,0 com HC1 1N[10]. A seguir adicionava-se 1% de Tripsina (Difco 1:250) e a mistura era incubada a 37°C por 45 minutos, com agitação nos primeiros 15 minutos e depois mantida em repouso por trinta minutos.

3.2.2 — Testes para detecção de Toxina

Camundongos de 14 a 16g eram inoculados intraperitonealmente com 0,5ml do produto obtido conforme descrito no item 3.2.1., com diluições em série em solução-tampão de gelatina fosfatada. A observação da morte dos camundongos era feita e anotada a partir de 24 horas até um período máximo de 96 horas.

4 — Preparação da Anatoxina

Foram selecionadas toxinas com título de 100.000 DMM/camundongos ou mais. A destoxificação da cultura foi obtida pela adição de formaldeído (conc. de 37%) na concentração final de 0,5%. O processo de destoxificação era completado na estufa a 37°C requerendo normalmente um período de incubação de 30 dias, com agitação a cada dois dias.

5 — *Prova de destoxificação*

Pela inoculação de 1,0ml do material por via intraperitoneal em 5 camundongos de 18 a 20g. O resultado era considerado satisfatório quando os animais sobreviviam sem sintomas, durante um período de vinte dias de observação. Caso os animais em testes morressem ou apresentassem sintomas, retornávamos o produto à estufa por mais 15 dias e repetíamos a prova. Se os sintomas persistissem era adicionado mais 0,5% de formaldeído e levado à estufa a 37°C por mais 10 dias e repetia-se a prova "in vivo".

6 — *Filtração da Anatoxina*

Era obtida por passagem seriada em filtros e membranas Millipore de 0,45 e de 0,22 micra, respectivamente, pois o filtro 90S da AMF reduzia o título do produto.

7 — *Provas efetuadas após a filtração*

7.1 — Toxicidade em cobaios: cinco cobaios de 250g recebiam cinco (5,0) ml da anatoxina por via subcutânea. A prova era considerada satisfatória desde que não ocorressem mortes ou sintomas durante 30 dias de observação.

7.2 — Esterilidade: Em meio de Tioglicolato Brewer e Sabouraud, onde eram semeados dois (2,0)ml do produto em 20ml do meio.

8 — *Preparação do antígeno para hiperimunização de cavalos*

8.1 — As anatoxinas com o pH corrigido para 6,0 com HC1 1N eram adicionadas de solução a 10% de sulfato duplo de alumínio e potássio (alúmen) em água destilada. A solução era previamente esterilizada por filtração em membrana de 0,22 micra. O volume adicionado com agitação constante era suficiente para obter-se concentração final de alúmen de 1,25%. Verificava-se no final da adição uma variação de pH que era corrigido a 5,8 com solução de hidróxido de sódio a 40% v/v. O precipitado resultante, após 24 horas de sedimentação, era recolhido e ressuspenso em solução salina, suficiente para recompor o volume inicial de anatoxina. Este procedimento era repetido quatro vezes ou até a obtenção de sobrenadante límpido.

8.2 — Avaliação do poder imunogênico do antígeno

Dez cobaios de 450g — 550g eram inoculados por via subcutânea com 1ml de antígeno. Após 40 dias os animais eram sangrados por punção cardíaca e os soros misturados em volumes iguais e titulados frente à toxina padrão. Foram selecionadas as anatoxinas que induziram títulos iguais ou superiores a duas Unidades Internacionais por ml no soro das cobaias.

Antes da utilização do antígeno em cavalos, as amostras eram selecionadas por hiperimunização de coelhos, com inoculações subcutâneas a cada 3 dias, iniciando-se com 0,1ml na primeira dose e 0,2ml, 0,3ml, 0,4ml, 0,5ml, 1ml, 1,5ml até 2,0ml nas doses subseqüentes.

9 — Hiperimunização de equídeos

A antitoxina botulínica tipo E foi obtida pela hiperimunização de quatro cavalos sadios pesando cerca de 400kg, com idade média de dois anos (304, 825, 837 e 997).

Esquemas de Hiperimunização

Foi adotada a técnica de produção de antitoxina botulínica tipos A e B que havia dado bons resultados [20,15].

Básico:

A sangria explorada, realizada sete dias após a última dose, indicava quais os animais que deveriam ser sangrados. O sangue era recebido sobre uma solução a 17% de citrato de sódio na proporção de 10% dessa solução em relação ao volume de sangue a ser colhido. Foram aproveitados os animais que apresentaram níveis de anticorpos ao redor de 100 UI/ml de soro. Após a sangria os animais eram colocados em recuperação por 45 dias.

Hiperimunização:

Foram aproveitados para a produção de antitoxina os plasmas de animais com níveis de anticorpos igual ou superior a 100 UI/ml. As reimunizações eram feitas sistematicamente após 45 dias de recuperação, segundo o mesmo esquema de hiperimunização.

9.1 — Obtenção do plasma hiperimune

Após a sedimentação das hemácias por 24 horas a 4°C, o plasma era separado e adicionado de solução de fenol, para concentração final de 0,4g%. Os plasmas eram mantidos a 4°C até o momento do processamento.

9.2 — Purificação e concentração do plasma

Obtidas por digestão enzimática segundo o método de Pope[21].

10 — Provas efetuadas

10.1 — Titulação de antitoxinas do plasma e soro purificado

Os plasmas e os soros purificados e concentrados eram titulados em camundongos, de acordo com o método padronizado pelo National Institute of Health[5], utilizando um soro padrão proveniente do "International Laboratory of Biological Standards by Statens Serum Institute", de Copenhagem. A toxina de referência era preparada em nosso próprio laboratório e padronizada frente ao soro padrão acima mencionado, ao nível de L+/100. Esta toxina era conservada pela adição em partes iguais soro/glicerina neutra e mantida a -20°C.

O soro antibotulínico tipo E produzido foi diluído de modo a conter 500 UI/ml[5] e submetido aos controles químicos e biológicos exigidos pela Farmacopéia Brasileira[13].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como o título antitóxico obtido pela hiperimunização de cavalos está diretamente relacionado à toxigênese do antígeno, procuramos selecionar as cepas de diferentes procedências.

As cepas de Nanaimo 1E, 42E e 48E não se apresentaram tóxicas para

o meio utilizado, enquanto que as 38E, 44E e 2E eram pouco tóxicas, titulando ao redor de 1000 DMM em camundongo. Mesmo após tripsinização, as toxinas derivadas destas cepas apresentaram títulos ao redor de 5000 DMM, essas toxinas mesmo assim foram destoxificadas e após as provas de inocuidade satisfatórias foram precipitadas pelo sulfato duplo de alumínio e potássio, porém inoculadas em coelhos e cobaios para verificação da imunogenicidade não foram satisfatórias como se esperava.

As cepas EK e EKX, que se apresentaram altamente tóxicas, ao serem semeadas em diferentes meios de cultura a saber: Müller modificado por Lathan, meio de Duff modificado e meio de TPGY, apresentaram comportamento muito variável, sendo que o meio de TPGY foi o que demonstrou melhor resultado. Foi verificado também que o tempo ótimo de toxigênese era de seis dias a 30°C, ocorrendo declínio a partir do 7º dia. Após o período de incubação a cultura era tratada com tripsina 1/250 (DIFCO) na concentração final de 1%. A elevação da toxicidade deve-se, provavelmente, à conversão da protoxina, pela tripsina, em toxina ativa.

Ficou ainda demonstrado que o processo de filtração da toxina acarreta perda de 90% da toxicidade, quando utilizamos a placa esterilizante 90S, a utilização de membrana 0,45 micra e 0,22 micra (tabela 1) não altera a toxicidade do produto.

A quantidade de formaldeido a ser empregada na destoxificação varia de acordo com o título da toxina. Levando em conta esse fato, determinamos a quantidade de formaldeido necessária para completa destoxificação sem prejuízo do poder imunogênico. (Tabela 2)

O alúmen de potássio na proporção de 1,25% como adjuvante, confirmou para esta cepa os ótimos resultados verificados na obtenção de outros soros antibotulínicos. O poder imunogênico da toxina derivada da cepa EK foi testado em cobaios e coelhos, apresentando títulos ao redor de 16 UI/ml e 50 UI/ml respectivamente.

Estabelecidos os parâmetros passamos a produzir a toxina botulínica em maior escala, e os lotes preparados e respectivos títulos constam na tabela 2. Foi utilizada a cepa EK que possuía todas as características necessárias para a produção do soro antibotulínico tipo E. A anatoxina proveniente do filtrado tóxico e tratado pelo formaldeído e pelo sulfato duplo de alumínio e potássio é a que foi utilizada na imunização de eqüídeos para a produção do plasma antibotulínico, o qual concentrado e purificado pelo método de Pope apresentou resultado satisfatório.

A tabela 3 mostra o resultado do doseamento do soro antibotulínico específico, onde os níveis antitóxicos atingiram os valores de cerca de 1000 UI/ml.

Finalmente este soro purificado e concentrado era diluído convenientemente para apresentar 500 UI/ml de antitoxina tipo E, de acordo com as recomendações estabelecidas na XV Seção de Expert. Committee on Biological Standartization da OMS.

CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos na produção de soro antibotulínico tipo E concluímos que:

a) das oito amostras de *Cl. botulinum* testadas somente a EK e a EKX mostraram-se adequadas produzindo toxinas titulando cerca de 1×10^5 a 4

HIGASHI, H.G.; OLIVEIRA, E.P.T. de; ROLIM ROSA, R.; SILVA, M.A. da; FRATELLI, F.; ENOKI, N.; IIZUKA, H. Preparação e teste da toxina botulinica tipo "E" e do seu anti-soro específico. **Mem. Inst. Butantan, 51** (1):5-13, 1989.

x 10^5 DMM para camundongo

b) dos três meios de cultura testados, verificamos que o meio TPGY foi o melhor

c) a tripsinização é importante na ativação da toxigênese do material produzido

d) é recomendada a filtração da toxina em membrana inerte de 0,22 micra

e) a quantidade de formaldeído necessária à destoxificação de toxina por nós obtida foi de 0,5% a 0,6% conforme o título, ocorrendo a transformação em anatoxina ao redor de 30 a 45 dias a 37°C

f) a mistura de plasmas resultante de diversas imunizações permitiu obter soro purificado e concentrado cujo título atingiu níveis da ordem de 750 a 1.000 UI/ml

g) esta primeira produção de soro antibotulínico tipo E para fins terapêuticos, no Brasil, abriu a possibilidade de obtenção do soro tipo ABE, que já consta da lista de soros hiperimunes produzidos no Instituto Butantan.

TABELA 1

Demonstração de perdas de toxina pela utilização de diferentes tipos de filtros: de profundidade e membrana inerte.

Lote	Título antes da filtração em DMM	Título após filtração em 90 S em DMM	Título após filtração em membrana inerte, em DMM
1	100.000	10.000	100.000
2	300.000	10.000	300.000
3	400.000	12.000	380.000
4	200.000	20.000	200.000

TABELA 2

Atividades destoxificante de diferentes concentrações de formaldeído, relacionadas ao título tóxico do produto.

Lote	Título da Toxina em DMM	Formaldeído %	Destoxificação a 37°C após 30 ou 45 dias
1/82	200.000	5,0	30
2/82	100.000	5,0	30
3/82	100.000	5,0	30
4/82	300.000	6,0	45
5/82	150.000	5,0	30
6/82	300.000	6,0	45
1/83	500.000	6,0	45
2/83	600.000	6,0	45
3/83	400.000	6,0	45
4/83	600.000	6,0	45

TABELA 3

Níveis de antitoxina botulínica tipo E, obtidos em quatro cavalos, após a purificação*.

Lotes dos soros antibotulínicos tipo E	Título em UI/ml	Tempo de observação em horas			
		24	48	72	96
Soro Dialisado 1-85-8	500	0/4	0/4	0/4	0/4
	600	0/4	1/4	2/4	2/4
	800	1/4	3/4	3/4	3/4
Soro Dialisado 1-84-54	300	0/4	0/4	0/4	0/4
	600	0/4	0/4	0/4	0/4
	1000	0/4	0/4	0/4	0/4
Soro Dialisado 2-83-78	500	0/4	0/4	0/4	0/4
	600	0/4	0/4	0/4	0/4
	800	0/4	0/4	4/4	—

* Dose individual de 0,5ml das misturas de toxina e antitoxina, pela via intraperitonial, em camundongos de 18g a 22g, sendo a toxina ao nivel de 0,01 L+, frente ao soro padrão internacional.

ABSTRACT: The present paper describes the method employed in the preparation of *Clostridium botulinum* type E antitoxin by horse hyperimunization with mixed alum potassium adsorbed antigen, that was the schema used in production of type A botulinum antitoxin. After Pope's method of purification and concentration the final titres reached values of 750 to 1.000 UI/ml.

KEYWORDS: Botulism; *Clostridium botulinum* Type E food poisoning, toxin, toxoid and antitoxin.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Rosalvo Guidolin, pelas sugestões e pelo seu espírito de colaboração, que, sem medir esforços, revisou este trabalho, e ao Sr. Silvio de Jesus pela colaboração no preparo de meios de cultura e nas inoculações dos doseamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 — AJMAL, M.B.C. Nobbs. Incidence an significance of colonial variation in *Clostridium botulinum* tipo A. In: INGRAN, M. & ROBERTO, T.A., Ed. *Botulism.* INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF FOOD MICROBIOLOGY, 5. *Proc.* Moscow, Chapman and Hall Limitil, London, p. 459-476, 1967.

2 — AURELI, P.; FENICIA, L.; FERRINI, A.M. Intossicazione alimentare da *Clostridium botulinum* tipo E. *Boll. Ist. sieroter. milan., 63* (6): 553-555, 1984.

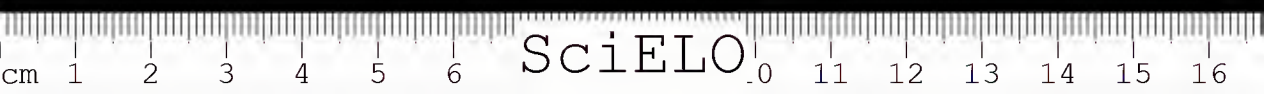
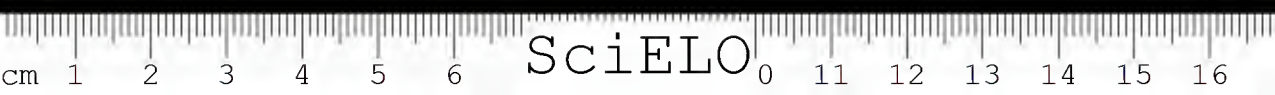
3 — BARRET, D.H.; EISENBERG, M.S.; BENDER, T.R.; BURKS, J.M.; HATHEWAY, C.L.; DOWELL JR., V.R. Type A and type B botulism in the North: First reported cases due to toxin other than type E in alaskan Imuit. *Canad. med. Ass. J., 117* (5): 483-489, 1977.

4 — BOWMER, E.J.; WILKINSON, D.A. Botulism in Canada. *Canad. med. Ass. J., 115* (11): 1084-1085, 1976.

5 — BOWMER, E.J. Preparation and assay of the International Standards for *Clostridium botulinum* types A,B,C,D and E antitoxin. *Bull. Org. mond. Santé, 29*: 701-9, 1963.

6 — Center for Disease Control. — a. Annual Sumary, 1977. Reported Morbidity in United States. 1977. *MMWR, 26:* 2-6, 1978.

7 — Center for Disease Control. Botulism: California. *MMWR, 27:* 501-502, 1978.
8 — Center for Disease Control. Botulism — United States, 1978. *MMWR, 28:* 73-75, 1979.
9 — Center for Disease Control. Botulism — United States, 1979-1980. MMWR, 30 (10): 121-122, 1981.
10 — GRAIG, J.M.; HAYNES, S.; PILCHER, K.S. Incidence of *Clostridium botulinum* tipo E in salmon and other marine fish in the Pacific Northwest. *Appl. Microbiol., 16:* 553-557, 1968.
11 — CHERINGTON, M.; DENVER, M.D. Botulism — Ten year experience. *Arch. Neurol., 30* (6), 432-437, 1974.
12 — DUFF, J.T., WRIGTH, G.G.; YARINSKY, A. Activation of *Clostridium botulinum* type F. Toxin by trypsin. *J. Bact., 72:* 455-460, 1956.
13 — FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 2. ed. — São Paulo, Indústria Gráfica Siqueira S.A. 1959. pp. 1027-35.
14 — GUNNISON, J.B.; CUMMINGS, J.R.; MEYER, K.F. *Clostridium botulinum* type E. *Proc. Soc. exp. Biol. med. 35:* 278-280, 1937.
15 — HIGASHI, H.G.; IIZUKA, H.; OLIVEIRA, E.P.T.; SILVA, M.A. Preparação do soro antibotulínico tipo B pela hiperimunização de cavalos no Instituto Butantan, *Mem. Inst. Butantan, 42/43:* 77-85, 1978/79.
16 — HOLDERMAN, L.V.; MOORE, W.E.C. *Anaerobe laboratory manual* Virginia Polytchnique Institute and State University Blancking, 1972. 130p.
17 — HUSS, H.H.; PEDERSEN, A. *Clostridium botulinum* in Fish Nordisk. VETERINAER-MEDICIN, Copenhagen, *31:* 214-221, 1979.
18 — JOHNSON, H.M.; SMITH, B.; HALL, H.E.; LEWIS, K.H. Serological specificity of types A and B botulinal toxins and antitoxins. *Proc. Soc. exp. Biol. med., 126:* 856-61, 1967.
19 — OLIVEIRA, E.P.T. Estudos sobre a preparação de soro antibotulínico tipo A. *Mem. Inst. Butantan, 36:* 1-40, 1972.
20 — OLIVEIRA, E.P.T.; IIZUKA, H.; HIGASHI, H.G.; SILVA, M.A.; ROLIM ROSA, R. Emprego simultâneo de antígenos botulínicos tipos A e B em um mesmo animal, para obtenção de antitoxina bivalente. *Mem. Inst. Butantan, 44/45:* 307-315, 1980/81.
21 — POPE, C.G. The action of proteolitic enzymus on the antitoxins and proteins in immune sera. II — Heat denaturation after partial enzyme a action *Brit. J. exp. Path. 20:* 201-212, 1939.
22 — SMITH, G.R.; MORYSON, C.J. The low prevalence of *Clostridium botulinum* in the lakes, marshes and waters ways of Camargue. *J. Hyg., 78:* 33-38, 1977.
23 — SMITH, L.D.; HOBBS, G. Clostridium. In: BUCHANAN, R.E. & GIBBON, N.E., Ed. *Bergey's manual of determinative bacteriology.* 8 ed. Baltimore, Williams & Wilkins Company, pp. 551-72.
24 — UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE. Bacteriological analytical manual for foods. Food and Drug Administration, U.S.D.H.E.W. 5 ed. 1-16, 1978.

Mem. Inst. Butantan
51 (1): 15-24, 1989.

SOBRE A EVOLUÇÃO DE *ASCARIS LUMBRICOIDES* LINNAEUS, 1758, NA FASE LARVAR ENDOVULAR*

Paulo de Toledo ARTIGAS
Marlene Tiduko UETA

RESUMO: Ovos de *A. lumbricoides* colhidos em fezes humanas foram cultivados em solução de formol a 1%, em temperatura ambiente (27C). Foi observado, durante o decurso do experimento, que larvas L_1 aparecem, em média, após 12,7 dias; larvas L_2 surgem aos 15,7 dias e a segunda muda ocorre ao redor de 18,3 dias, ocasionando a formação da larva infectante L_3, que ainda permanece dentro do ovo. Ovos de culturas de 10 a 25 dias foram utilizados para infectar 80 camundongos albinos Swiss, machos e fêmeas. Os camundongos foram separados em 16 grupos de 5 indivíduos; os componentes desses grupos foram infectados, sucessivamente, dia a dia; o primeiro grupo com ovos de cultura de 10 dias, o segundo com ovos de 11 dias e, assim, sucessivamente, até o 16º grupo que recebeu ovos com 25 dias de cultura. A partir do terceiro dia pós-infecção, um camundongo, de cada um dos 16 grupos, foi sacrificado; isso foi feito em 5 dias subseqüentes, para cada grupo. Foi realizada, nos animais sacrificados, a necrópsia com finalidade parasitológica, visando a pesquisa de larvas. Larvas migrantes foram encontradas no fígado e pulmões nos camundongos dos grupos que receberam ovos com, pelo menos 18 dias de cultura. Tal resultado comprova, cabalmente, que somente os ovos com larvas L_3 são infectantes.
UNITERMOS: *Ascaris lumbricoides*, desenvolvimento do ovo, camundongo

INTRODUÇÃO

É, na verdade, muito curioso, em se tratando de um parasita extremamente freqüente e intensamente estudado, que não exista uniformidade entre os autores, no que se refere à evolução do *Ascaris lumbricoides* Linnaeus, 1758, na fase endovular.

Brumpt[5], em seu tratado de Parasitologia, ao se referir ao desenvolvimento da larva do *Ascaris lumbricoides,* dentro do ovo, afirma que ela sofre uma, ou talvez duas mudas.

Há um trabalho de Henner[6], citado por Araujo[6], em que aquele pesquisador, ao infectar camundongos com ovos de *Ascaris suum*, observava que os seus roedores somente apareciam infectados quando as larvas endovulares já tinham realizado duas ecdises.

UNICAMP, Instituto de Biologia, Departamento de Parasitologia, Caixa Postal 6109, 13081, Campinas, SP, Brasil.
*Auxílio FAPESP
Recebido para publicação em 12/5/1988 e aceito em 3/11/1988.

Schacher[9], com *Toxocara canis*, verificou, em pequeno percentual de larvas, em cultura de ovos, a presença de uma bainha cuticular se sobrepondo à cutícula da primeira ecdise. Schacher[9], todavia, não interpretou o fato como demonstrativo da ocorrência da segunda ecdise, mas como uma cutícula intumescida e simulando duas camadas.

Thust[10], utilizando microscopia eletrônica, relata a presença de uma segunda muda na larva endovular de *Ascaris lumbricoides*, que ocorreria em ovos, 18 a 20 dias após o início do desenvolvimento, conservados a temperatura de 28C.

Na década de 70, com as publicações de Araujo[1, 2, 3, 4] e de Maung[7], ficou bem comprovada a ocorrência da segunda ecdise intra-ovular em diferentes ascarídeos.

Outro aspecto que merece ser focalizado é o tempo necessário, no meio exterior, para que a larva intra-ovular do *A. lumbricoides* se torne efetivamente infectante.

Roberts[8], em pesquisa que se tornou clássica e em que se fundamentam autores de livros de texto de Parasitologia, observou que os ovos larvados de *Ascaris lumbricoides* somente se tornam infectantes depois de, pelo menos, 20 dias de permanência no meio exterior.

Maung[7] verificou em camundongos, que a infecção somente se positiva quando são utilizados ovos de cultura de 20 dias.

Ao dar início à presente pesquisa, era nosso escopo deixar bem confirmado qual o período, no meio exterior, necessário para que estivesse desenvolvida a larva infectante do *Ascaris* do homem e que, sem dúvida, a infecção do hospedeiro definitivo se processa com a ingestão da L_3.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cultura de ovos

Fezes humanas, com ovos de *A. lumbricoides*, foram obtidos no Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Campinas, SP.

As fezes foram desmanchadas em água de torneira e processada a concentração de ovos, em cálices cônicos e através de peneira com malhas de 400μm. Uma vez concentrados, os ovos foram transferidos para uma solução de formol a 1% e mantidos na geladeira a aproximadamente 4C.

Inicialmente, foram feitas culturas em estufa a 27C e em temperatura ambiente (24-27C); como não tivesse sido observada diferença na formação das larvas, em um ou outro modo de agir, passou-se a utilizar somente culturas em meio ambiente.

Foram efetuadas, diariamente, durante 25 dias consecutivos, a partir do sexto dia de cultura, observações em microscopia direta e em contraste de fase, para se acompanhar o processo evolutivo da larva.

Uma vez verificada a presença de ovos larvados, eram eles submetidos à ligeira pressão, entre lâminas de vidro, para se provocar a ruptura da casca do ovo e a exteriorização da larva.

As larvas exteriorizadas foram examinadas dia a dia, para a constatação da presença de cutícula ou cutículas destacadas.

A verificação da sucessão de ecdises larvárias (L_1, L_2 e L_3), em função do tempo, é o resultado de observação, aproximada, de 100 ovos por dia, nos períodos citados; esta prática permitiu a informação sobre o "número médio de dias" necessário para a evolução do nematódeo.

Larvas, em fases sucessivas da experiência, foram fotografadas e medidas com auxílio da câmara clara.

2. Infecção de camundongos

Oitenta camundongos foram distribuídos em grupos de 5 e feita sua infecção, a partir do décimo dia de cultura de ovos, até o vigésimo quinto dia. Formaram-se, portanto, 16 grupos de camundongos infectados diariamente.

Foram utilizados camundongos jovens Swiss, machos e fêmeas, com peso aproximado de 15g. A infecção se fez com emprego de sonda fina de borracha, introduzida pelo esôfago. Cada camundongo recebeu cerca de 200 ovos.

A partir do terceiro dia pós-infecção, foram sacrificados os camundongos dos 16 grupos, sucessivamente em 5 dias, um em cada dia. Os animais foram colocados em ambiente saturado de éter e processada a pesquisa parasitológica, visando o encontro de larvas em migração. Nas necrópsias fez-se tal pesquisa no sangue, nódulos linfáticos, coração, intestino, fígado e pulmões.

Os órgãos examinados, à parte o sangue observado a fresco, entre lâmina e lamínula, eram dilacerados com estilete e pinça, em solução salina.

Positivada a presença de larvas, estas eram colhidas, procurando-se obter o maior número delas, em cálices cônicos. A seguir, as larvas eram fixadas em líquido de Railliet-Henry, a quente e, posteriormente, examinadas e medidas.

Atuando dessa maneira, foi possível verificar, com segurança, o número de dias exigidos para que a larva endovular se torne infectante e qual, efetivamente, é a larva infectante.

RESULTADOS

1. Cultura de ovos

O aparecimento de larvas se verificou na totalidade dos ovos. Ao fim de uma média de 12,7 dias de cultura, já eram observadas as primeiras larvas.

A primeira larva (L_1) é muito frágil e se esfacela com facilidade. Apresenta a cutícula lisa, desprovida de qualquer ectoformação; seu tubo digestivo ainda não está bem definido, sendo pouco precisa a diferenciação do esôfago e do intestino. Nota-se que a extremidade proximal é ligeiramente "aparada", tendendo para a condição de extremidade truncada (fig. 1). Verifica-se, ainda, na extremidade oral a presença de uma formação estiletiforme, mais quitinisada e que acompanha a cutícula, quando esta se destaca, ao aparecer a L_2; é ainda visível, quando a L_2 já se encontra definida; a cauda termina em ponta e é mais curta que a cauda da L_2 ou da L_3.

A L_2 aparece, em média, ao redor de 15,7 dias, na cultura mantida em temperatura ambiente; a identificação de L_2 se comprova pela presença da cutícula da L_1 (fig. 2). A larva L_2 é mais robusta, resistindo melhor à compressão entre lâminas; é freqüente a presença, em sua extremidade proximal, de uma disposição em forma de calota. Na microscopia direta, ainda oferece dificuldade o exame da organologia interna; porém, em contraste de fase, já se destaca bem o esôfago diferenciado.

A L_3 começa a surgir, em média, aos 18,3 dias de cultura, em temperatura ambiente e tem como caráter essencial a presença das cutículas de L_1

ARTIGAS, P. de T & UETA, M.T. Sobre a evolução de *Ascaris lumbricoides Linnaeus*, 1758, na fase larvar endovular. **Mem. Inst. Butantan, 51** (1): 15-24, 1989.

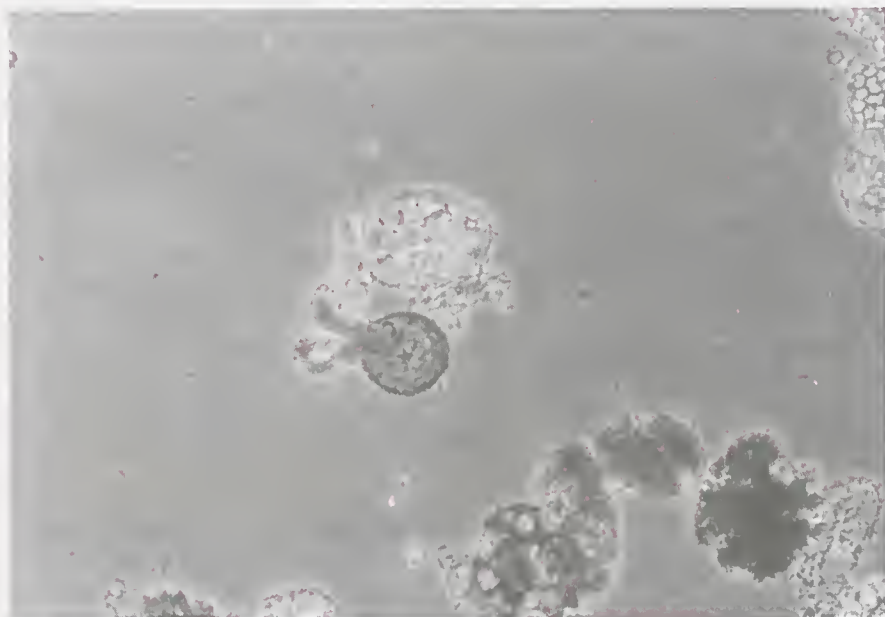



Figura 1 — Larva L_1 — Aumento 113x.

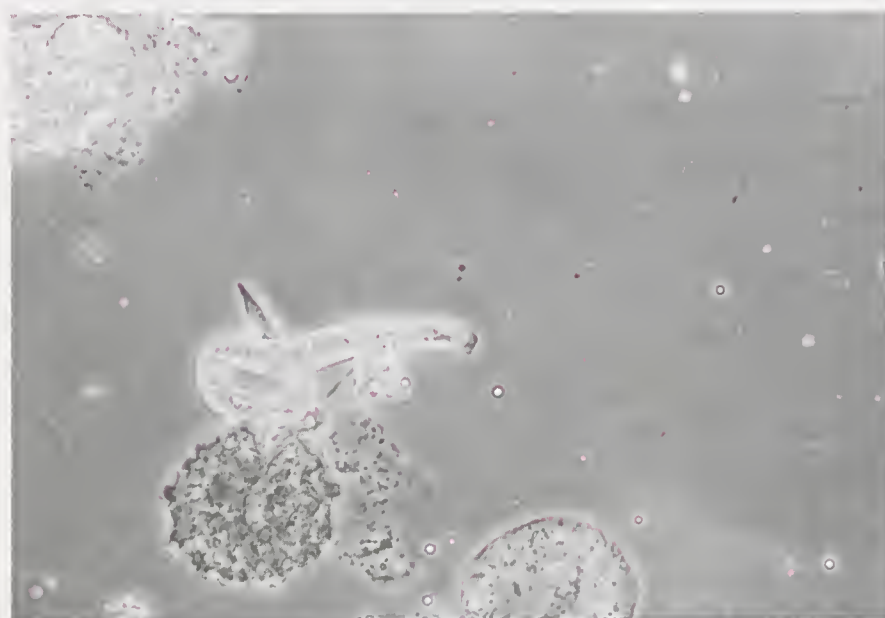



Figura 2 — Larva L^2, com uma cutícula descolada. Aumento 222x

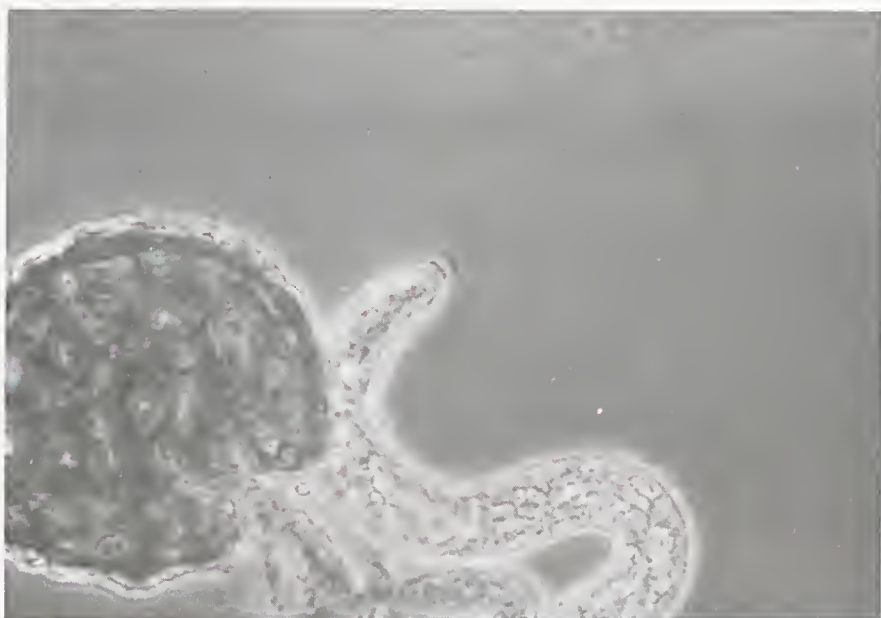



Figura 3 — Larva L_3, com duas cutículas descoladas. Aumento 463x.

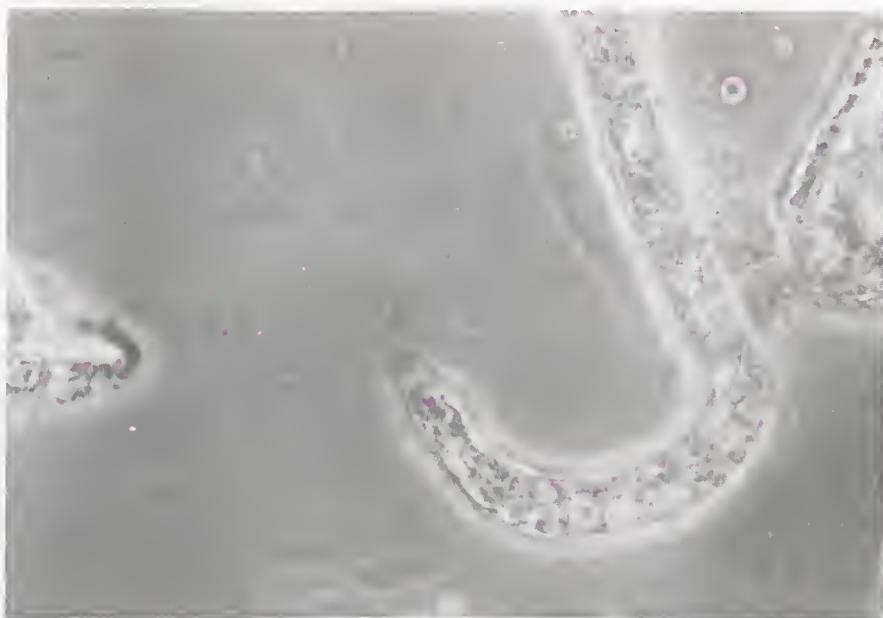



Figura 4 — Larva L_4, com três cutículas descoladas. Aumento 445x.

e de L_2, descoladas e "vestindo" a L_3 (fig. 3). A organologia interna desta larva é observada com maior facilidade na microscopia de fase, que põe em destaque o tubo digestivo, com esôfago e intestino diferenciados. Encontrou-se certa dificuldade em diferenciar as larvas L_2 das L_3, quando ambas se mostravam nuas, isto é, sem as cutículas descoladas das fases precedentes. Isto se deve, às escassas modificações morfológicas, na passagem do segundo para o terceiro estágio. Segundo Araujo[2] não existem caracteres diferenciais entre os dois estágios, exceto a evidência das cutículas descoladas.

Tivemos ensejo de observar, uma única vez, uma larva com três cutículas descoladas, portanto em L_4 (fig. 4); este achado anormal, em nosso experimento, foi verificado em uma cultura em meio ambiente, ao fim de 21 dias.

Foram medidas larvas em cultura de 23, 28, 35 e 45 dias; os resultados de tais medidas estão apresentados na Tabela 1. Nesta Tabela, também aparecem dados relativos à temperatura ambiente, anotados no decorrer do desenvolvimento dos ovos.

TABELA 1

Medidas de larvas de *Ascaris lumbricoides* de cultura, em solução formulada a 1%, mantidas em temperatura ambiente.
(Medidas médias de 30 larvas em mm; temperatura média em C).

Temperatura ambiente média (C)	Nº de dias de cultura	medida do comprimento e largura (mm) (média aritmética)	tamanho mínimo e tamanho máximo (comprimento e largura)
26,9	23	0,2357 x 0,0131	0,1951 a 0,2682 comprimento x 0,0097 a 0,0146 largura
26,9	28	0,2414 x 0,0129	0,1951 a 0,2926 comprimento x 0,0097 a 0,0146 largura
26,7	35	0,2446 x 0,0132	0,1951 a 0,3414 comprimento x 0,0097 a 0,0170 largura
27,7	45	0,2373 x 0,0137	0,1951 a 0,2926 comprimento x 0,0097 a 0,0195 largura

2. Infecção de camundongos

Esta operação visou, sobretudo, comprovar ser, realmente, a L_3 a larva infectante.

Nos camundongos dos grupos 1 a 8, infectados com material de cultura de menos de 18 dias, foi constantemente negativo o encontro de larvas migrantes.

A partir das infecções com material de cultivo com 18 ou mais dias, os camundongos passaram a apresentar larvas migrantes no fígado. Na Tabela 2, estão assinaladas as larvas colhidas no figado.

O encontro de larvas nos pulmões se verifica, e passa a ser constante a partir do quarto dia de pós-infecção; à medida que cresce o número de larvas nos pulmões, decresce o número de larvas no fígado; esta observação confirma, no camundongo, a passagem prévia das larvas do intestino para o fígado e deste órgão para o pulmão.

As larvas recolhidas do fígado medem, em média, 0,35mm a 0,92mm (Tabela 2); quanto mais tardia a colheita, maiores eram as larvas.

Nos pulmões, larvas colhidas no quarto dia pós-infecção mediam, em média, 0,51mm; no oitavo dia pós-infecção, atingiam a 1,29mm (Tabela 3).

Resumindo o aspecto biológico do experimento, é possível afirmar o seguinte: nos quarto e quinto dias pós-infecção é maior o número de larvas no fígado do que nos pulmões; as larvas pulmonares colhidas nos quarto e quinto dias pós-infecção são de tamanho semelhante ao das larvas hepáticas e vão se tornando maiores nos dias subseqüentes; as Tabelas 2 e 3 ilustram estas observações. Somente as inoculações com culturas de, pelo menos, 18 dias, em temperatura ambiente, ao redor de 24 a 27C, são positivas; culturas de menos de 18 dias, não dão ensejo à presença de larvas no camundongo.

No nosso experimento, o encontro de larvas no sangue, nódulos linfáticos, coração e intestino foi sempre negativo em todos os camundongos examinados.

DISCUSSÃO

São, decididamente, as tradicionais observações de Roberts[8] que vêm servindo de suporte aos tratadistas, para as informações, em livros de texto. Tais informações, à luz das recentes pesquisas, destacando-se as de Araujo[2] e de Maung[7] e as apresentadas nesta publicação, devem ser atualizadas, pois modificam a noção biológica de Roberts[8], até agora consolidada, na sua aparência, como definitiva.

Roberts[8] observou que a infecção experimental de camundongos somente se positiva quando os ovos de *A. lumbricoides* têm, pelo menos, mais de 18 dias de vida no meio ambiente.

Vários pesquisadores realizaram trabalhos em que estudaram a infecção experimental de camundongos com ovos de *A. lumbricoides*, visando, sobretudo, esclarecimentos sobre os estágios larvários; nem sempre foram bem-sucedidos. Mas, ficou comprovada a necessidade de um tempo mínimo de permanência dos ovos no meio exterior para que a infecção fosse positiva; neste período, no meio externo, desenvolve-se o processo larvário intra-ovular.

Verificou-se, neste trabalho, a seqüência biológica da larva do *A. lumbricoides*: o ovo é eliminado do hospedeiro sem apresentar diferenciação da futura larva; esta se corporifica ao fim de, aproximadamente, 12,7 dias (L_1); ao fim de 15,7 dias, aparece a L_2; ao redor de 18,3 dias, se positiva a L_3 — caracterizada pela presença de duas cutículas, reliquat de L_1 e L_2.

ARTIGAS, P. de T & UETA, M.T. Sobre a evolução de *Ascaris lumbricoides Linnaeus*, 1758, na fase larvar endovular. **Mem. Inst. Butantan, 51** (1). 15-24, 1989.

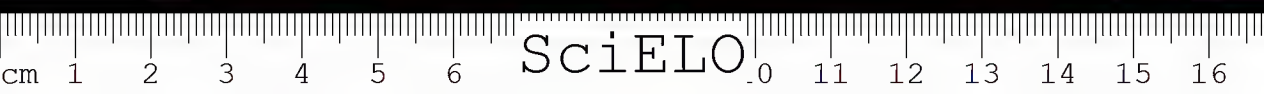



TABELA 2

Medidas (comprimento x largura) em mm das *Ascaris lumbricóides*, colhidas no fígado de camundongos, em dias subseqüentes de pós-infecção. Os números representam a média de 10 larvas (exceto nos assinalados).

Grupo	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia
9	–	0,0 x 0,0 (5)	0,6015 x 0,0308 (3)	0,9268 x 0,0439 (1)	0,0 x 0,0	0,0 x 0,0
10	–	0,4633 x 0,0223	0,6682 x 0,0284	0,7145 x 0,0397	0,7743 x 0,0353 (4)	–
11	0,3194 x 0,0170	0,4389 x 0,0243 (2)	0,6438 x 0,0289	0,7536 x 0,0358	0,7072 x 0,0377	–
12	0,3487 x 0,0190	0,4633 x 0,0238	0,6023 x 0,0304	0,7121 x 0,0341	0,8609 x 0,0441	–
13	0,3170 x 0,0165	0,4902 x 0,0282	0,6633 x 0,0350	0,7097 x 0,0336	0,7877 x 0,0397	–
14	0,3243 x 0,0192	0,4438 x 0,0245	0,6072 x 0,0314	0,7584 x 0,0407	–	0,9975 x 0,0499
15	0,3950 x 0,0207	0,5462 x 0,0277	0,7267 x 0,0331	–	0,8731 x 0,0387	0,9219 x 0,0392
16	0,3975 x 0,0197	0,5023 x 0,0248	–	0,8975 x 0,0392	0,8902 x 0,0414	0,8316 x 0,0404
$\bar{x}$	0,3503 x 0,0186	0,4782 x 0,0250	0,6447 x 0,0311	0,7818 x 0,0381	0,8155 x 0,0394	0,9170 x 0,0431

(1) medida de uma única larva
(2) média de 2 larvas
(3) média de 3 larvas
(4) média de 4 larvas
(5) ausência de larvas

TABELA 3

Medidas (comprimento x largura) em mm das larvas de *Ascaris lumbricóides*, colhidas no pulmão de camundongos, em dias subseqüentes de pós-infecção. Os números representam a média de 10 larvas (exceto nos assinalados).

Grupo	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia
9	–	0,0 x 0,0	0,0 x 0,0	0,0 x 0,0	0,0 x 0,0	1,5121 x 0,0829 (1)
10	–	0,0 x 0,0	0,0 x 0,0	0,5438 x 0,0199	1,0487 x 0,0492	1,2397 x 0,0658 (4)
11	0,0 x 0,0 (5)	0,0 x 0,0	0,0 x 0,0	0,8755 x 0,0438	0,8041 x 0,0460	–
12	0,0 x 0,0	0,2926 x 0,0195 (1)	0,7438 x 0,0304 (2)	0,8536 x 0,0487	0,9389 x 0,0548	–
13	0,0 x 0,0	0,5853 x 0,0292 (1)	0,7365 x 0,0377	0,8097 x 0,0431	1,0292 x 0,0565	–
14	0,0 x 0,0	0,7560 x 0,0377 (2)	0,4999 x 0,0267 (2)	0,8487 x 0,0409	–	1,2975 x 0,0684
15	n m. (3)	0,4923 x 0,0170 (2)	0,6829 x 0,0357 (3)	–	0,9950 x 0,0514	1,4853 x 0,0709
16	0,0 x 0,0	n m (1)	–	0,9414 x 0,0428	0,9999 x 0,0526	0,9121 x 0,0477
$\bar{x}$		0,5090 x 0,0258	0,6657 x 0,0326	0,8121 x 0,0398	0,9693 x 0,0517	1,2893 x 0,0671

(1) medida de uma única larva
(2) média de 2 larvas
(3) média de 3 larvas
(4) média de 6 larvas
(n m) não medido
(5) ausência de larvas

Uma vez formada a L_3, esta não necessita de um período de amadurecimento para se tornar infectante. Não obstante, constatou-se que larvas L_3 de mais idade, por exemplo 63 dias, chegam ao fígado dos camundongos 24 horas após a ingestão do ovo. Tal verificação está de acordo com a de Maung[7], de que larvas de culturas mais velhas eclodem, no tubo digestivo de camundongos, mais precocemente. A L_3 liberada do ovo no tubo digestivo do camundongo, despoja-se das cutículas e se localiza no fígado, 24 a 72 horas após a ingestão do ovo; do fígado passa para o pulmão, onde atinge dimensão avantajada (no presente experimento, até 1,29mm), de onde se transfere, via árvore brônquica, traquéia, esôfago, estômago, para o intestino delgado.

As larvas começam a aparecer no fígado poucas horas após a ingestão oral; permanecem neste órgão de 5 a 7 dias; no sétimo dia, neste experimento, ainda eram encontradas larvas em número razoável.

ARTIGAS, P. de T. & UETA, M.T. Sobre a evolução de *Ascaris lumbricoides* Linneu, 1758, na fase larvar endovular. **Mem. Inst. Butantan, 51** (1):15-24, 1989.

CONCLUSÃO

1. É no meio externo, ao fim de cerca de 18,3 dias, que se processa a segunda ecdise larvar, dando origem à larva L_3.

2. O ovo de *A. Lumbricoides* torna-se infectante somente quando contém uma larva que sofreu duas mudas. Assim, à semelhança do que acontece com os nematódeos em geral, a larva infectante do *A. lumbricoides* é a L_3.

3. A larva L_3, após diferenciação, está imediatamente apta para infectar o hospedeiro definitivo. Não obstante, larvas L_3 de culturas mais velhas são encontradas, em condição experimental, no fígado de camundongos, mais precocemente.

ABSTRACT: Eggs of *A. lumbricoides* obtained from human feces were cultured in 1% formaldehyde solution at room temperature (27C). It was observed that during this period L_1 larvae were formed inside the egg after 12,7 days in average. L_2 larvae appeared in 15,7 days and the second molt occurred in about 18,3 days, causing the formation of infective L_3 larvae, which also remained within the egg. Cultured eggs, 10 to 25 days old were then used to infect 80 young albine Swiss mice, males and females. The mice were divided in 16 groups of 5 animals, and each group was infected once. The infection was performed daily and the first group was infected with 10 day-old eggs. The last group (16) received 25 day-old eggs. Since the third day after infection, one individual of the group was killed each day consecutively for five days and larvae were searched in a parasitological necropsy. Wandering larvae were found in the liver and lungs only in those groups infected with eggs cultured for at least 18 days. These results showed that only the eggs which have L_3 larvae are infective to the host.

KEYWORDS: *Ascaris lumbricoides*, egg development, mice.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, P. Considérations sur la deuxième mue des larves d'Ascarides parasites de serpents. *Ann. Parasitol.* (Paris), *46*:605-612, 1971.
2. ARAUJO, P. Observações pertinentes às primeiras ecdises de larvas de *Ascaris lumbricoides, A. suume Toxocara canis. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, 14*:83-90, 1972.
3 ARAUJO, P. Observations sur le cycle biologique de d'Ascaride *Polydelphis quadrangularis* (Schneider, 1866) parasite du serpent crotale. *Ann. Parasitol.* (Paris), *47*:91-120, 1972.
4. ARAUJO, P. & BRESSAN, M.C.R.V. Considérations sur la deuxième mue des larves d'*Ascaridia galli. Ann. Parasitol.* (Paris), *52*:531-537, 1977.
5. BRUMPT, E. Précis de Parasitologie. 6. ed., Vol. I. Paris, Masson et Cie., 1949. 1042 p.
6. HENNER, A. apud ARAUJO, P. Fase migratória tecidual de *Ascaris suum* Goeze, 1782: estudo experimental relativo a modificações cuticulares de suas larvas. São Paulo, 1973. Tese de Livre-Docência — Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
7. MAUNG, M. The occurrence of the second moult of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum. Int. J. Parasitol.*, *8*:371-378, 1978.
8. ROBERTS, F.H.S. The large roundworms of pigs, *Ascaris lumbricoides* L., 1758. The Animal Health Station, Yeerongpilly, 1934. 81 p. (Bulletin n. 81).

ARTIGAS, P. de T & UETA, M.T. Sobre a evolução de *Ascaris lumbricoides Linnaeus*, 1758, na fase larvar endovular. **Mem. Inst. Butantan, 51** (1): 15-24, 1989.

9. SCHACHER, J.F. A contribution to the life history and larval morphology of *Toxocara canis*. J. Parasitol., *43*:599-612, 1957.
10. THUST, R. Submikroskopische Untersuchungen über die Morphogenese des Integumentes von *Ascaris lumbricoides* L., 1758. *Z. Wiss. Zool.*, Abt. A, *178*:1-39, 1968.

Mem. Inst. Butantan
51 (1):25-32, 1989.

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS VENENOS DE SERPENTES DO GÊNERO *BOTHROPS*, PROCEDENTES DO ESTADO DE SÃO PAULO E DO ESTADO DO PARANÁ COM ALGUMAS ESPÉCIES MORFOLOGICAMENTE DUVIDOSAS

Maria Amélia Lopes PERRONE*
Medardo SILES VILLARROEL**
Maria de Fátima Domingues FURTADO***

RESUMO: Os venenos de serpentes *Bothrops moojeni, Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararacussu* procedentes do Estado de São Paulo, foram comparados com os venenos das mesmas espécies procedentes da região de Itaipu, Estado do Paraná e de alguns exemplares de serpentes de Itaipu com características morfológicas entre *B.moojeni* e *B.neuwiedi* e entre *B.moojeni* e *B.jararacussu*. Os parâmetros analisados foram: letalidade, eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, imunodifusão e imunoeletroforese. Os valores da DL_{50} dos venenos das espécies *B.moojeni* e *B.neuwiedi*, não apresentam diferenças significativas quanto à letalidade; contudo, os venenos de *B.jararacussu* apresentam diferenças, sendo que os espécimes de São Paulo possuem letalidade mais elevada em relação aos de Itaipu. Os venenos de *B.moojeni* e *B. neuwiedi* procedentes das duas regiões não apresentaram variações em seus padrões eletroforéticos, já os venenos de *B.jararacussu* apresentaram algumas diferenças nos eletroferogramas. Os exemplares de serpentes de Itaipu com características morfológicas entre *B.moojeni* e *B.neuwiedi* (*Bothrops* sp 1) e entre *B.moojeni* e *B.jararacussu* (*Bothrops* sp 2), quanto ao perfil eletroforético, assemelham-se ao veneno da espécie *B.moojeni*. A análise dos componentes imunogênicos dos venenos das três espécies, através das técnicas de imunodifusão e imunoeletroforese, não apresentam variações apreciáveis.

UNITERMOS: — Letalidade, imunoquímica, venenos botrópicos.

INTRODUÇÃO

Trabalhos anteriores demonstraram que ocorrem variações intraespecíficas na composição dos venenos, em função da distribuição geográfica (Jiménez-Porras, 1964, 1967; Aragon & Gubensek, 1981; Glenn et al, 1983; Rael et al, 1984).

* Bolsista da FUNDAP — Seção de Venenos do Instituto Butantan.
** Professor Adjunto do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
*** Pesquisador Científico da Seção de Venenos do Instituto Butantan.

Endereço para correspondência: Departamento de Imunologia — Edifício Biomédicas III — Cidade Universitária — CEP 05508 — São Paulo — Brasil.
Instituto Butantan — CP 65-01051 — São Paulo — Brasil.

Recebido para publicação em 29-3-1988 e aceito em 3-11-1988.

PERRONE, M.A.L.; SILES VILLARROEL, M.; FURTADO, M. de F.D. Estudo comparativo entre os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, procedentes do Estado de São Paulo e do Estado do Paraná com algumas espécies morfologicamente duvidosas. **Mem. Inst. Butantan, 51**:(1):25-32, 1989.

Estas variações bioquímicas e farmacológicas mostram diferenças significativas em algumas propriedades tais como a letalidade, atividade enzimática, padrões eletroforéticos, efeitos locais, reações imunológicas e outras (Minton, 1967, 1975; Fiero et al, 1972; Bonilla et al, 1973; Gutiérrez & Chaves, 1980).

O gênero *Bothrops*, com ampla distribuição pelas Américas Central e do Sul, é o grupo de serpentes peçonhentas mais importante em número de espécies e densidade populacional, sendo responsável por aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos na casuística do Hospital Vital Brasil (Instituto Butantan, Hospital Vital Brazil, 1982).

Há poucos estudos comparativos dos venenos, relativos à distribuição geográfica destes animais, no território nacional (Gonçalves & Vieira, 1950; Gonçalves & Deustsch, 1956, Schenberg, 1959).

Contando com centenas de serpentes capturadas durante o represamento das águas da Usina de Itaipu, no Estado do Paraná, e classificadas no Instituto Butantan como pertencentes às espécies *Bothrops moojeni, Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararacussu,* e alguns exemplares que apresentavam características morfológicas entre *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi* e outros entre *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacussu,* propusemo-nos a estudar comparativamente os venenos dos animais pertencentes a esta região com os venenos das mesmas espécies procedentes do Estado de São Paulo, quanto à:

1. Determinação da letalidade dos venenos em camundongos inoculados pela via intraperitoneal e seus resultados expressos em DL_{50};
2. Verificação do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida com SDS, dos venenos;
3. Verificação dos componentes imunológicos, através das reações de imunodifusão e imunoeletroforese.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Venenos utilizados

Foram utilizados os venenos das espécies de serpentes *B.moojeni* (Hoge, 1965); *B.neuwiedi* (Wagler in Spix, 1924) e *B.jararacussu* (Lacerda, 1884) procedentes do Estado de São Paulo e de Itaipu (Noroeste do Estado do Paraná); e desta mesma procedência os venenos dos espécimes que apresentam características morfológicas entre *B.moojeni* e *B.neuwiedi* denominados por nós *Bothrops* sp 1 e os venenos de espécimes com características do *B.moojeni* e *B.jararacussu* denominados de *Bothrops* sp 2. Estes venenos foram obtidos de vários exemplares adultos, por extração manual, secos à vácuo e mantidos na geladeira a ± 4°C, fornecidos pela Seção de Venenos do Instituto Butantan.

Os venenos foram preparados a 1% em solução salina estéril a 0,85% e centrifugados a 5000 rpm durante 20 minutos a 15°C, para eliminar eventuais impurezas em suspensão. Os sobrenadantes foram distribuídos em tubos de ensaio, em volumes de 1ml cada e mantidos, no congelador, a — 25°C.

No momento do uso, procedia-se ao descongelamento.

2. Determinação da letalidade dos venenos

2.1. Animais utilizados, via de inoculação e volume inoculado

Empregamos camundongos brancos (*Mus musculus* Linnaeus, 1758), Swiss Webster, de ambos os sexos, adultos jovens pesando 20 ± 2 gramas, procedentes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, considerados animais convencionais, nos quais inoculamos 0,5ml de cada dose, pela via intraperitoneal. Os lotes de camundongos foram em número de cinco por dose.

2.2 — Período de observação

Os camundongos foram observados nos períodos de 24 horas e 48 horas após as respectivas inoculações.

2.3 — Cálculo da DL_{50}

A determinação da toxidade dos venenos estudados foi calculada através do método de Spearman-Karber, descrito e recomendado pela OMS (1981).

3. Eletroforese, imunodifusão e imunoeletroforese

3.1 — Para a eletroforese em gel de poliacrilamida em placa, utilizou-se basicamente o método preconizado por Laemmli (1970), que consiste, em linhas gerais, de um gradiente em acrilamida de 8-16%, com SDS, aplicando-se 20 microlitros (200 ug) de solução de veneno em cada canaleta. Submeteu-se a 200V, corrente de 7,5mA inicial, seguida de 15mA durante 6 horas. O gel foi corado com Coomassie Brilhant Blue-R250 durante 24 horas, descorado com solução de etanol, ácido acético e água (1:2:20), e conservado em solução de ácido acético a 7%.

Para a densitometria, a placa de gel foi fotografada em Kodalit, procedendo-se a leitura no densitômetro Ata 60, filtro 500mV, abertura 7 e velocidade de 100mm por minuto.

3.2 — Para a imunodifusão e imunoeletroforese foi utilizado o método descrito por Siles Villarroel (1972); Siles Villarroel et al. (1974).

RESULTADOS

Os resultados da letalidade dos oito venenos estudados, provenientes do Estado de São Paulo e Itaipu (Paraná), constam na Tabela I.

TABELA I

Resultados da DL_{50} obtidos pelo método de Spearman-Karber dos venenos estudados.

Veneno das Espécies	Procedência	DL_{50} — Spearman-Karber ug/camundongo	Variação 95% de confiança
B.moojeni	São Paulo	115,81	99,69 — 134,54
B.moojeni	Itaipu	110,07	98,66 — 112,80
B.neuwiedi	São Paulo	46,64	41,34 — 52,62
B.neuwiedi	Itaipu	58,33	52,03 — 65,40
B.jararacussu	São Paulo	78,25	72,84 — 84,06
B.jararacussu	Itaipu	116,68	105,68 — 128,82
Bothrops sp 1	Itaipu	137,40	123,34 — 153,07
Bothrops sp 2	Itaipu	123,38	118,05 — 128,96

PERRONE, M.A.L.; SILES VILLARROEL, M.; FURTADO, M. de F.D. Estudo comparativo entre os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, procedentes do Estado de São Paulo e do Estado do Paraná com algumas espécies morfologicamente duvidosas. Mem. Inst. Butantan, 51:(1):25-32, 1989.

A Tabela 1 resume os valores das DL_{50}, quanto à letalidade dos venenos. Segundo o método de Spearman-Karber, os valores expressos com os intervalos de confiança de 95% demonstram que não encontramos diferenças significativas quando comparamos os venenos de *Bothrops moojeni* de São Paulo e Itaipu; o mesmo ocorreu com os venenos de *Bothrops neuwiedi*.

Encontramos diferenças bastante significativas, quando comparamos os valores da DL_{50} dos venenos de *Bothrops jararacussu* de São Paulo e Itaipu.

A letalidade dos venenos dos exemplares com características morfológicas entre *B.moojeni* e *B.neuwiedi* (denominado por nós de *Bothrops* sp 1) está mais próxima da DL_{50} do veneno de *B.moojeni* do que a DL_{50} do veneno de *B.neuwiedi* procedentes de Itaipu.

A letalidade dos venenos com características morfológicas entre *B.moojeni* e *B.jararacussu* (denominado de *Bothrops* sp 2) está próxima da DL_{50} dos venenos de *B.jararacussu* e *B.moojeni* procedentes de Itaipu.

Os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS para os oito venenos estudados estão expressos na Fig. 1.

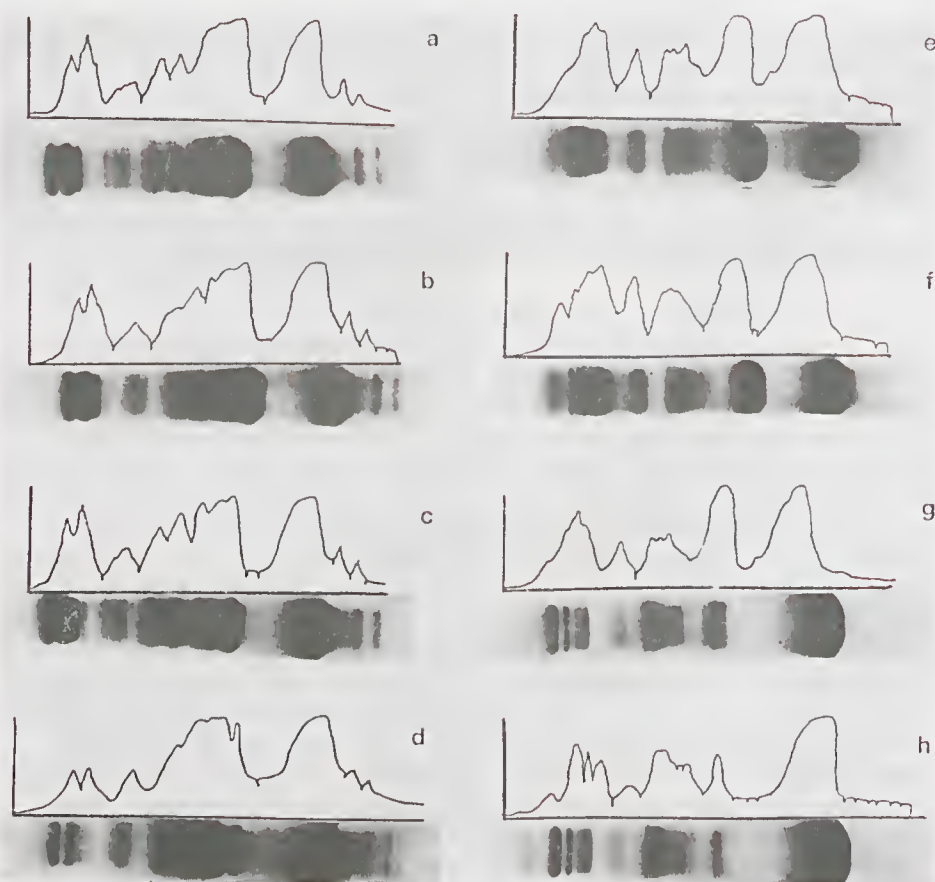



FIGURA 1 — Curvas densitométricas e eletroferogramas dos venenos de: a — *B.moojeni* — São Paulo, b — *B.moojeni* — Itaipu, c — *Botrops* sp 1 — Itaipu, d — *Bothrops* sp 2 — Itaipu, e — *B.neuwiedi* — São Paulo, f — *B.neuwiedi* — Itaipu, g — *B.jararacussu* — São Paulo, h — *B.jararacussu* — Itaipu.

Os resultados da eletroforese dos venenos de *B.moojeni* procedentes do Estado de São Paulo e de Itaipu (Paraná) apresentam o mesmo número e localização das bandas, demonstrando que não há diferenças apreciáveis entre os venenos comparados (Fig. 1a e b). As mesmas observações foram verificadas com os venenos de *B.neuwiedi* (Fig. 1e e f).

Os venenos de *B.jararacussu* procedentes das diferentes localidades apresentam pequenas variações, principalmente relacionadas à concentração, isto se observa no penúltimo componente dos padrões eletroforéticos (Fig. 1g e h).

O perfil eletroforético (c) do veneno de serpentes com características morfológicas de *B.moojeni* e *B.neuwiedi*, denominado por nós *Bothrops* sp 1, assemelha-se aos padrões eletroforéticos de *B.moojeni* de São Paulo e Itaipu (a e b) e difere bastante dos venenos de *B.neuwiedi* (e e f).

O perfil eletroforético (d) do veneno de serpentes com características morfológicas de *B.moojeni* e *B.jararacussu*, denominado por nós *Bothrops* sp 2, assemelha-se aos padrões eletroforéticos de *B.moojeni* de São Paulo e Itaipu (a e b), apresentando concentrações menores para os dois primeiros componentes e diferindo bastante dos venenos de *B.jararacussu* (g e h).

Os resultados do estudo comparativo entre os oito venenos, através das técnicas de imunodifusão e imunoeletroforese, não incluídos, não apresentam variações ponderáveis.

DISCUSSÃO

A despeito da comprovação da extensa variabilidade dos venenos em serpentes (Gloyd, 1940; Gonçalves & Vieira, 1950; Gonçalves & Deustsch, 1956; Schenberg, 1959; Aragon e Gubensek, 1981; Rael et al., 1984), vários autores como Jiménez-Porras (1964, 1967) concluem que as variações nos venenos são de origem genética. E Saint-Girons & Detrait (1978), estudando a antigenicidade dos venenos das serpentes européias, coloca-os como caracteres válidos para fins sistemáticos.

Furlaneto et al. (1973) e Siles Villarroel (1977), estudando a DL_{50} dos venenos botrópicos, demonstraram que o veneno de cada espécie de serpente possui uma determinada letalidade conforme a via de inoculação e animal experimentado.

Siles Villarroel (1977) e Siles Villarroel et al. (1978/79), trabalhando com venenos procedentes de várias regiões, encontraram para *B.moojeni* a DL_{50} de 105,50 ug, enquanto que os valores da DL_{50} por nós obtidos para a mesma espécie procedente de São Paulo foram de 112,00 ug e de 99,71 ug para Itaipu. Os mesmos autores determinaram a DL_{50} para *B.neuwiedi* de 54,17 ug, sendo os nossos valores 46,0 ug e 62,08 ug, respectivamente. O veneno de *B.jararacussu* apresentou, para os autores loc. cit., o valor de 103,79 ug e os nossos resultados foram de 76,38 ug e 121,89 ug, demonstrando que nos venenos desta espécie ocorre variação mais ampla de letalidade e os espécimes de São Paulo possuem ação mais elevada.

Quanto aos venenos dos espécimes com características morfológicas entre *B. moojeni* e *B. neuwiedi* denominado de *Bothrops* sp 1 com DL_{50} de 137,40 ug está mais próximo à letalidade dos venenos de *B. moojeni* de São Paulo e Itaipu (DL_{50} = 115,81 ug e 110,07 ug, respectivamente) e muito distante da DL_{50} dos venenos de *B. neuwiedi* das duas localidades (DL_{50} =

46,64 ug e 58,33 ug), sugerindo tratar-se da espécie de *B.moojeni* quando analisado conjuntamente com os resultados da eletroforese.

Quanto aos venenos dos espécimes com características morfológicas entre B.moojeni e *B.jararacussu* denominado de *Bothrops* sp 2 com DL_{50} de 123,38 ug está próximo tanto da letalidade dos venenos de *B.moojeni* de São Paulo e Itaipu (DL_{50} = 115,81 ug e 110,07 ug) quanto da letalidade do veneno de *B.jararacussu* procedente de Itaipu (DL_{50} = 116,68 ug). Também neste caso a letalidade por si só é insuficiente para definir a espécie, porém quando analisada conjuntamente com os resultados da eletroforese sugere tratar-se da espécie *B.moojeni*.

Com relação à eletroforese, Gonçalves & Vieira (1950), analisando os venenos de serpentes brasileiras, verificaram váriações geográficas nos de *Crotalus durissus terrificus*, demonstrando que os venenos procedentes do Sul do Brasil e da Argentina apresentam crotamina, enquanto que os de outras regiões não apresentam. Aragon & Gubensek (1981) observaram que o veneno de *Bothrops asper* diferia em função de sua zona de ocorrência.

Os venenos de *B.moojeni* procedentes de São Paulo e Itaipu não demonstraram diferenças quanto aos perfis eletroforéticos, o mesmo ocorrendo com os venenos de *B.neuwiedi;* já a espécie *B.jararacussu* de São Paulo e Itaipu apresenta pequenas variações nos padrões eletroforéticos.

E os venenos de *Bothrops* sp 1 e *Bothrops* sp 2 assemelham-se ao perfil eletroforético de *B.moojeni*.

Schenberg (1963), em estudo comparativo entre os venenos de subespécies de *B.neuwiedi* brasileiras, utilizou a técnica de imunodifusão, encontrando diferenças imunológicas nestes venenos. Tu & Ganthavorn (1968), comparando os venenos de *Naja naja siamensis* e *Naja naja atra*, encontraram padrões idênticos de imunodifusão e ligeiras diferenças nos padrões imunoeletroforéticos, indicando que estas subespécies são similares mas não idênticas.

Com os venenos das três espécies procedentes de regiões diferentes, utilizando as técnicas de imunodifusão e imunoeletroforese, obtivemos resultados semelhantes entre as espécies, não ocorrendo variação significativa quanto ao número de linhas de precipitação.

CONCLUSÕES

1. Os venenos de *B.moojeni* e *B.neuwiedi* procedentes da região de Itaipu e do Estado de São Paulo não apresentam diferenças significativas dentro de cada espécie, quanto à letalidade e aos padrões eletroforéticos.
2. Os venenos de *B.jararacussu* procedentes das duas regiões apresentam diferenças significativas quanto à letalidade, sendo mais ativos os venenos de São Paulo em relação aos venenos de Itaipu, quanto aos padrões eletroforéticos não apresentam diferenças significativas.
3. Os exemplares de serpentes de Itaipu com características morfológicas entre *B.moojeni* e *B.neuwiedi (Bothops* sp 1) e entre *B.moojeni* e *B.jararacussu (Bothrops* sp 2), quanto ao perfil eletroforético, assemelham-se ao veneno da espécie *B.moojeni*.
4. A análise dos componentes imunogênicos dos venenos das três espécies através das técnicas de imunodifusão e imunoeletroforese não apresenta variações apreciáveis.

PERRONE, M.A.L.; SILES VILLARROEL, M.; FURTADO, M. de F.D. Estudo comparativo entre os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, procedentes do Estado de São Paulo e do Estado do Paraná com algumas espécies morfologicamente duvidosas. **Mem. Inst. Butantan, 51**:(1):25-32, 1989.

ABSTRACT: The venoms of *Bothrops moojeni, Bothrops neuwiedi* and *Bothrops jararacussu* from the State of São Paulo, were compared to samples from the Itaipu region, State of Paraná as a whole. Some of the specimens from Itaipu present morphological aspects of both *B.moojeni and B.neuwiedi* and some others of both *B.moojeni* and *B.jararacussu*. Their toxic activity (DL_{50}), SDS polyacrylamide gel electrophoresis, immunodiffusion and imunoelectrophoresis patterns were assayed. The DL_{50} values of *B.moojeni* and *B.neuwiedi* venoms showed no difference in toxicity. However, the venoms of *B.jararacussu* of the Itaipu region differed from those of São Paulo specimens, which showed higher toxicity. The electrophoretic patterns of the venoms of *B.moojeni* and *B.neuwiedi* from both regions showed no significant variation in the electropherograms. Possible intergrade specimens of *B.neuwiedi/B.moojeni* (B.sp 1) and *B.jararacussu/B.moojeni* (B.sp 2) venom samples had *B.moojeni* characteristics. The immunogenic components of the three venoms showed no apparent variation.

KEYWORDS: toxicity, imunochemistry, botropic venoms.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAGON, F. & GUBENSEK, F. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. *Toxicon, 19*: 797-805, 1981.
2. BONILLA, C.A.; FAITH, M.R.; MINTON Jr., S.A. L amino acid oxidase, phosphodiesterase, total protein and other properties of juvenile timber rattlesnake *(C.h. horridus)* venom at different stages of growth. *Toxicon, 11*: 301-303, 1973.
3. FIERO, M.K.; SEIFERT, M.W.; WEAVER, T.J.; BONILLA, C.A. Comparative study of juvenile and adult prairie rattlesnake *(Crotalus viridis viridis)* venoms. *Toxicon, 10*: 81-82, 1972.
4. FURLANETTO, R.S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F. Contribuição ao estudo da determinação da DL_{50} de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus*-Linnaes, 1758.
   II — Possibilidade de determinação da DL_{50} através da inoculação prévia de doses infraletais do próprio veneno. *Mem. Inst. Butantan, 37*: 109-122, 1973.
5. GLENN, J.L.; STRAIGHT, R.C.; WOLFE, M.C.; HARDY, D.L. Geographical variation in Crotalus scutulatus scutulatus (Mojave rattesnake) venom properties. *Toxicon, 21*(1): 119-130, 1983.
6. GLOYD, H.K. The Rattlesnakes, Genera Sistrurus and *Crotalus*. Chicago Academy of Sciences Special publication nº 4, 1940.
7. GONÇALVES, J.M. & DEUSTSCH, H.F. Ultracentrifugal and zone electrophoresis on some Crotalidae venoms. *Arch. Biochem. Biophys, 60*: 402-411, 1956.
8. GONÇALVES, J.M. & VIEIRA, L.G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I — Análise eletroforética. *An. Acad. Bras. Cienc., 22*: 141-150, 1950.
9. GUTIÉRREZ, J.M. & CHAVES, F. Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricences de los géneros *Bothrops, Crotalus* y *Lachesis*. *Toxicon, 18*: 315-321, 1980.
10. INSTITUTO BUTANTAN, HOSPITAL VITAL BRASIL. Manual para atendimento dos acidentes humanos por animais peçonhentos. São Paulo, 1982.
11. JIMÉNEZ-PORRAS, J.M. Intraspecific variations in composition of venoms of the jumping viper, *Bothrops nummifera*. *Toxicon, 2*: 187-195, 1964.
12. JIMÉNEZ-PORRAS, J.M. Differentiation between *Bothrops nummifer* and *Bothrops picadoi* by means of the biochemical properties of their venoms. *Toxicon, 4*: 300-322, 1967.
13. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature, Lond. 227: 680, 1970.
14. MINTON, S.A. Observation on toxicity and antigenic make-up of venoms from juvenile snakes. In: RUSSEL, F.E. Saunders, P. R. Animal Toxins. Oxford, Pergamon Press, 1967.
15. MINTON, S.A. A note on the venom of an aged rattlesnake. *Toxicon, 13*: 73-74, 1975.
16. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. Caracterisation des venins et standardisation des sérums antivenimeux: progrès réalisés. Genêve, 1981. (OMS, Publication offset nº 58.)

PERRONE, M.A.L.; SILES VILLARROEL, M.; FURTADO, M. de F.D. Estudo comparativo entre os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, procedentes do Estado de São Paulo e do Estado do Paraná com algumas espécies morfologicamente duvidosas. **Mem. Inst. Butantan, 51**:(1):25-32, 1989.

17. ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos. In: VERONESI, R. Doenças infecciosas e parasitárias. 7. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982.
18. SAINT-GIRONS, H. & DETRAIT, J. Communautés antigéniques des venins et systématique des vipères européennes. Étude immunoelectrophorétique. *Bul. Soc. Zool., France, 103*(2): 155-166, 1978.
19. SCHENBERG, S. Geographical pattern of crotaline distribuition in the same rattlesnake subspecies. *Science, 129*: 1361-1363, 1959.
20. SCHENBERG, S. Immunological (Ouchterlony method) identification of intra subspecies qualitative differences in snake venom composition. *Toxicon, 1*: 67-75, 1963.
21. SILES VILLARROEL, M. Contribuição ao estudo de serpentes do gênero *Bothrops (B.jararaca, B.alternatus, B.insulares, B.jararacussu, B.atrox, B.cotiara)*. São Paulo, 1972 (Tese de Doutorado — Instituto de Ciências Biomédicas, USP).
22. SILES VILLARROEL, M. Contribuição ao estudo de venenos e antivenenos botrópicos. São Paulo, 1977 (Tese de Livre-Docência — Instituto de Ciências Biomédicas, USP).
23. SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; FURLANETTO, R.S. ROLIM ROSA, R. Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. *Mem. Inst. Butantan, 38*: 12-20, 1974.
24. SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R. FURLANETTO, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*: 311-324, 1978/79.
25. TU, A.T. & GANTHAVORN, S. Comparison of *Naja naja siamensis* and *Naja Naja atra* venoms. *Toxicon, 5*: 207-211, 1968.

Mem. Inst. Butantan
51(1):33-38, 1989

SOBREVIVÊNCIA DE *BOTHROPS JARARACUSSU* (SERPENTES, VIPERIDAE, CROTALINAE) MANTIDAS EM CATIVEIRO.

Frederico Fontoura LEINZ*
Thélia R. F. JANEIRO-CINQUINI*
Masaio Mizuno ISHIZUKA**
Luiza Vasconcelos LANG***

RESUMO: Serpentes *Bothrops jararacussu* ocorrem desde o sul do Estado de Minas Gerais até o nordeste da Argentina. O plantel destas serpentes mantidas em cativeiro no Instituto Butantan no período compreendido entre setembro de 1979 e julho de 1981, constituído de 42 fêmeas e 64 machos, foi analisado em função da taxa de mortalidade, freqüência sazonal de óbitos e tempo de sobrevivência também em função da estação do ano em que ocorreu a captura. Os autores verificaram que 50% dos animais vieram a óbito nos primeiros seis meses de cativeiro, não tendo havido diferença significante na mortalidade entre os sexos. Por outro lado, ocorreu uma incidência significante de óbitos de machos na primavera, quando se comparou a mortalidade de ambos os sexos em função das demais estações do ano. Em relação à época em que ocorreu a captura, verificou-se que os animais capturados na primavera e verão tiveram uma sobrevivência mais prolongada em relação às outras estações, fato este atribuído à provável reserva de energia acumulada naquelas estações.

UNITERMOS: Serpentes, sobrevivência, cativeiro.

INTRODUÇÃO

Serpentes peçonhentas têm sido mantidas em cativeiro visando o aproveitamento do veneno, largamente utilizado na produção de imunobiológicos e pesquisa.

Leloup[10] cita três sistemas de manutenção de serpentes: o intensivo, o semi-extensivo e o extensivo. Segundo o mesmo autor, apesar do primeiro ser o menos indicado, tal modalidade se impõe quando há necessidade em manter-se animais oriundos de climas diversos do local de cativeiro, por poder propiciar climatização do ambiente e controle individual dos animais, vindo assim ao encontro das necessidades do Instituto Butantan.

O presente trabalho tem como objetivos a avaliação do tempo de sobrevida, cálculo da mortalidade de machos e fêmeas em relação à estação do ano e taxa de sobrevivência relativa à estação em que ocorreu a captura

* Pesquisador Científico, Seção de Venenos, Instituto Butantan
** Professora Titular da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.
*** Bolsista da FUNDAP, Seção de Venenos, Instituto Butantan.

Recebido para publicação em 28-10-1988 e aceito em 10-2-1989.

das serpentes *Bothrops jararacussu* do plantel do Instituto Butantan, no período compreendido entre setembro de 1979 e julho 1981. Estas serpentes ocorrem desde o sul do Estado de Minas Gerais até o nordeste da Argentina (Peters[13]). Segundo Amaral[1], estão disseminadas pelos lugares baixos e alagadiços das zonas orientai, centro-ocidental e meridional, desde o litoral até o limite sul ocidental, onde continua nos países vizinhos. Vivem em campo coberto e à beira d'água ou em rios e lagoas, alimentandose de rãs e roedores. É espécie ovovivípara.

MATERIAIS E MÉTODOS

a — *SERPENTES*: Observou-se o plantel de *Bothrops jararacussu* da Seção de Venenos do Instituto Butantan de setembro de 1979 a julho de 1981, constituído de 106 serpentes, sendo 42 fêmeas e 64 machos de diferentes tamanhos e idades, recebidas regularmente e encaminhadas à produção de venenos sem passarem por um período prévio de adaptação. Não houve atendimento Médico Veterinário em nenhuma fase do cativeiro.

b — *MANUTENÇÃO*: Os animais eram mantidos individualmente em caixas de madeira medindo 50cm de comprimento, 40cm de largura e 25cm de altura, acomodadas em salas à temperatura de 21°C ± 3°C, sem controle de umidade. Nos dias mais frios de inverno aquecia-se o ambiente com auxílio de aquecedor elétrico. As salas eram iluminadas com luz artificial.

c — *ALIMENTAÇÃO*: Constituiu-se de camundongos albinos adultos fornecidos 7 dias após a extração de veneno, sendo variável a aceitação ou não do alimento por parte da serpente. A água era mantida em potes de barro à disposição do animal.

d — *EXTRAÇÃO*: As extrações eram realizadas a cada 28 dias, conforme rotina estabelecida pela Seção de Venenos.

e — *ANÁLISE ESTATÍSTICA*: Constituiu-se no cálculo do Coeficiente de Mortalidde Específico segundo sexo e estação do ano (Laurenti[9]), na aplicação do teste do Qui-Quadrado e "t de Student" (Vieira[17]). Fixou-se em 0,05 o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS

Os valores dos tempos de sobreviência de *Bothrops jararacussu* em cativeiro, expressos em dias e em função do sexo, encontram-se reunidos na Tabela 1 que permitiu o cálculo das medianas. Assim, as medianas da sobrevida foram iguais a 167,4 dias (5,6 meses) e 159,8 dias (5,3 meses), respectivamente para machos e fêmeas, dispensando-se qualquer elaboração estatística, pois as medianas afastaram-se muito pouco.

A Tabela 2 mostra a análise das taxas de mortalidade em função do sexo e a estação do ano em que ocorreu o óbito. Com base nesta tabela procedeu-se à análise do Qui-Quadrado que forneceu os valores 21,63 para machos e 1,62 para fêmeas, tendo sido significante somente para machos. A partir da mesma análise estatística procurou-se estabelecer qual a estação do ano responsável pela significância, considerando-se primavera e não primavera (verão + outono + inverno), visto que a maior mortalidade de machos ocorreu naquela estação. O teste do Qui-Quadrado forneceu o valor 15,5, que foi significante ao nível de rejeição adotado.

Os tempos de sobrevida de machos e fêmeas e respectivas médias dos

TABELA 1

Serpente *Bothrops jararacussu* em cativeiro segundo o tempo de sobrevida (dias) e sexo, S.P. 1979-1981.

SOBREVIDA (dias) \ SEXO	MACHOS		FÊMEAS		TOTAL	
	F	%	F	%	F	%
0 ⟼ 60	07	10,9	05	11,9	12	11,3
61 ⟼ 120	12	18,8	10	23,9	22	20,8
121 ⟼ 180	17	26,6	09	21,4	26	24,5
181 ⟼ 240	08	12,5	09	21,4	17	16,0
241 ⟼ 300	05	7,8	04	9,5	09	8,5
301 ⟼ 360	06	9,4	02	4,8	08	7,5
361 ⟼ 570	06	9,4	03	7,1	09	8,6
571 ⟼ 732	03	4,6			03	2,8
TOTAL	64	100,0	42	100,0	106	100,0
MEDIANA (Mi)	167,4 dias (5,6 meses)		159,8 dias (5,3 meses)			

TABELA 2

Freqüência de óbitos em cativeiro de *Bothrops jararacussu* no Instituto Butantan, segundo a estação do ano e sexo, SP, 1979-1981

ESTAÇÃO \ SEXO	MACHOS		FÊMEAS		TOTAL	
	F	%	F	%	F	%
PRIMAVERA	30	46,2	11	26,2	41	38,7
VERÃO	11	17,2	07	16,6	18	16,9
OUTONO	05	7,8	12	28,6	17	16,0
INVERNO	18	28,1	12	28,6	30	28,4
TOTAL	64	100,0	42	100,0	106	100,0

valores individuais, em função da estação do ano em que ocorreu a captura, são apresentados na Tabela 3.

Com base nesta tabela aplicou-se o teste "t de Student" para a diferença entre duas médias, tendo sido conduzido para cada estação do ano e entre os sexos. Este cálculo indicou que não houve diferença estatisticamente significante entre os sexos nas estações consideradas, o que permitiu selecionar para fins de cálculo apenas um dos sexos (machos). Esses valores encontram-se reunidos na Tabela 4 e mostram as médias dos tempos de sobrevida em relação às estações, tendo ocorrido maior sobrevivência quando a captura foi realizada na primavera e verão (Tabela 4).

LEINZ, F.F.; JANEIRO-CINQUINI, T.R.F.; ISHIZUKA, M.M.; LANG, L.V. Sobrevivência de *Bothrops jararacussu* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) mantidas em cativeiro. **Mem. Inst. Butantan, 51(1): 33-38, 1989.**

TABELA 3

Sobrevida (dias) em cativeiro de *Bothrops jararacussu* no Instituto Butantan segundo a estação do ano de captura e sexo, SP, 1979-1981

ESTAÇÃO DO ANO	PRIMAVERA		VERÃO		OUTONO		INVERNO	
Nº ORDEM \ SEXO	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
1	37	103	56	34	56	06	32	50
2	38	186	63	82	62	62	58	72
3	59	189	145	86	62	105	89	76
4	78	198	146	118	93	117	111	101
5	83	228	161	141	103	137	113	117
6	165	243	177	143	113	165	121	125
7	171	282	219	143	137	190	122	127
8	184	300	246	153	137		120	190
9	189	331	248	171	145		130	261
10	232		268	189	147		148	
11	308		289	224	162		148	
12	308		381	228	172		151	
13	323		386	267	220		190	
14	330		555	358	234		236	
15	337		594	401			253	
16	442		615	458			355	
17	497			500				
18	731							
$\bar{x}$ (dias)	250,7	228,9	284,3	217,4	131,6	111,7	148,6	124,3
s (dias)	181,7	69,6	177,4	136,2	55,0	62,0	79,0	65,4

TABELA 4

Valores de análise estatística de "t" para diferença entre duas medidas do tempo de sobrevida de *B. jararacussu* em relação à estação do ano em que ocorreu a captura.

CONTRASTE	t CALCULADO	G.L.	t_α
PRIMAVERA x VERÃO	0,48	32	1,645
PRIMAVERA x OUTONO	2,36 *	30	1,679
PRIMAVERA x INVERNO	2,07 *	32	1,645
VERÃO x OUTONO	2,77 *	28	1,701
VERÃO x INVERNO	1,92*	31	1,645
OUTONO x INVERNO	0,67	28	1,701

* Teste significante a nível de α = 0,05

DISCUSSÃO

O tempo de sobrevida de machos e fêmeas de serpentes *Bothrops jararacussu*, mantidas em sistema intensivo e destinadas à extração periódica de veneno, não apresentou diferença significante entre os sexos.

Observou-se que 50% da mortalidade de machos e fêmeas ocorreram

respectivamente nos primeiros 5,6 meses e 5,3 meses de cativeiro, valores estes considerados elevados quando comparados com os citados por Cowan[7]. Este autor afirma que a principal causa da mortalidade de serpentes em biotério é a "síndrome da má adaptação", responsável pela morte de 80% dos animais durante os dois primeiros anos de cativeiro. Esta síndrome leva o animal à inapetência, emagrecimento (embora o animal possa alimentar-se normalmente), fragilidade dos tecidos (resultando em ulceração da pele em pontos de fricção), aumento na susceptibilidade a infecções por microorganismos patogênicos e pelos normalmente inócuos.

A necessidade em extrair-se o veneno a cada 28 dias, operação traumática realizada pela compressão vigorosa e repetida da glândula venenífera, pode ter sido a principal causa do aumento na mortalidade do plantel analisado.

A taxa de mortalidade, em relação à estação do ano em que ocorreu a captura, indicou uma maior sobrevida de machos e fêmeas quando capturados na primavera e verão. Segundo Calow[5], a adaptação pode ser considerada um assunto de administração de energia. A adaptação a um ambiente que não o natural requer um aumento no consumo desta energia. Para Snyder[16], a resposta a esta demanda constitui-se em "stress", podendo em certos casos haver o consumo total de gordura para manter o equilíbrio interno do animal, com prejuízos imediatos às funções vitais como crescimento, reprodução e resistência à infecções. Sendo assim, uma sobrevivência mais prolongada das serpentes capturadas na primavera e verão, estaria relacionada com a maior oferta de alimentos na natureza durante as citadas estações, o que as levariam a suportar melhor e por mais tempo as conseqüências adversas do cativeiro, por disporem de maior reserva de energia.

CONCLUSÕES

1 — Não existe diferença significante na taxa de mortalidade entre os sexos.

2 — No plantel observado, 50% dos animais morreram nos primeiros 5,6 meses de cativeiro.

3 — Houve uma freqüência de óbitos mais significante de machos na primavera.

4 — Animais capturados na primavera e verão sobreviveram por tempo mais prolongado em cativeiro quando comparados com os capturados no outono e inverno.

ABSTRACT: The group of snakes *Bothrops jararacussu* maintained in captivity in the Butantan Institute from September 1979 to July 1981, consisting of 42 females and 64 males, was analysed regarding the mortality rate, the seasonal frequency and the survival rate related to the season of the year when the snakes were captured. The authors observed that 50% of the animals died during the first six months following the capture, and there was no significant difference in the mortality. On the other hand, a significant incidence of male mortality was observed in Spring when compared in both sexes focusing the season of the year. Animals captured during Spring and Summer have prolonged survival rates when compared to those taken during Fall and Winter. This fact may be atributed to the greater amount of energy accumulated during those seasons.

KEYWORDS: Snakes, survival, captivity.

LEINZ, F.F.; JANEIRO-CINQUINI, T.R.F.; ISHIZUKA, M.M.; LANG, L.V. Sobrevivência de *Bothrops jararacussu* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) mantidas em cativeiro. **Mem. Inst. Butantan, 51**(1): 33-38, 1989.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, A. *Serpentes do Brasil; iconografia colorida.* São Paulo, Melhoramentos — MEC/EDUSP, 1977 220 p.
2. ASHEY, B.D. & BURCHFIELD, P.M. Maintenance of snake colony for the purpose of extraction. *Toxicon, 5*: 267-275, 1968.
3. BELLUOMINI, H. Venom production of snake in captivity. *Mem. Inst. Butantan, 32*: 79-88, 1965.
4. BELLUOMINI, H. Extraction and quantities of venom obtained from some Brazilian snakes. In: Venomous animals and their venoms. New York/London, Academic Press, 1968. v. 1, p. 9-117.
5. CALOW, P. Ecology, evolution and energetics: a study in metabolic adaptation. *Adv. ecolog. Res., 10*: 1-62, 1977.
6. CONANT, R. Reptile and amphibian management practices at Philadelphia Zoo. *Int. Zoo. Yearb., 11*: 224-230, 1971.
7. COWAN, D.F. Diseases of captive reptiles. Am. Vet. Med. Assoc., *153*: 848-859, 1968.
8. COWAN, D.F. Adaptation, maladaptation and disease. In: MURPHY, J.B. Reproductive biology and diseases of captive reptiles. Lawrence, Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 1980. p. 191-196.
9. LAURENT, R.; MELLO JORGE, M.H.P.; SEBRÃO, M.L. & GOTLIEB, S.L.D. Estatística de saúde. São paulo, EPU/EDUSP, 1985. 186 p.
10. LELOUP, P. Essais de rationalisation dans le maintien d'un serpentarium à but industriel. *Acta Tropica, 30*: 281-311, 1973.
11. LELOUP, P. Various aspects of venomous snake breeding on large scale. *Acta Zool. Path. Antverpiensia, 78*: 177-198, 1984.
12. MARCUS, L.C. Infections diseases of reptiles. *J. Am. Vet. Med. Assoc., 159*: 1626-1631, 1971.
13. PETERS, J.A.; OREJAS MIRANDA, B. Catalogue of neotropical squamata, Part 1. Snakes. Washington, Smithsonian Institution Press, 1970 p. 47.
14. RATALIFFE, H.L. Diets for zoological gardens: disease control. *Int. Zoo. Yearb., 6*: 4-23, 1986.
15. REGAL, P.J. Thermophilic response following feeding in certain reptiles. *Copeia,*: 588-590, 1966.
16. SNYDER, R.L. The biology of population growth. New York, St. Martin's Press, 1976.
17. VIEIRA, S. Introdução à bioestatística. São Paulo, Campus, 1988. 294 p.
18. WALLACH, J.D. Medical care of reptiles. *J.Am. Vet. Med. Assoc., 155*: 1017-1034, 1969.
19. WALLACH, J.D. Diseases of reptiles and their clinical management. In: Current Veterinary Therapy. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1971. v. 6.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. Somente serão aceitos trabalhos inéditos e que se destinem exclusivamente à revista. É proibida a reprodução com fins lucrativos. Os artigos de revisão serão publicados a convite da Comissão Editorial.
2. Os trabalhos deverão ser redigidos em português, inglês ou francês, datilografados preferencialmente em máquina elétrica, em espaço duplo em 3 (três) vias, em papel formato ofício e numerados no ângulo superior direito.
3. No preparo do original será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura: **Página de rosto:** título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e filiação científica. **Texto:** introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referência bibliográfica. **Material de referência:** resumos (em português e inglês); unitermos (palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo; devem ser incluídas até um limite máximo de três, em português e inglês).
4. As referências bibliográficas deverão ser ordenadas alfabeticamente e numeradas.
   Exemplos:
   Para livros: autor, título, edição, local de publicação, editor, ano, páginas.
   7. BIER, O. Microbiologia e imunologia. 24.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Para artigos: autor, título do artigo, título do periódico, volume, página inicial e final, ano.
   8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA F.º, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan, 40/41:** 1-9, 1976/77.
   As citações no texto devem ser por números-índices correspondentes às respectivas referências bibliográficas.
   Exemplos:
   ... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ... segundo vários autores[2,3,4]
5. As ilustrações (fotos, tabelas, gráficos etc.) deverão ser originais e acompanhadas de legendas explicativas. As legendas serão numeradas e reunidas em folha à parte. Os desenhos deverão ser a nanquim e as fotografias bem nítidas, trazendo no verso o nome do autor e a indicação numérica da ordem a ser obedecida no texto. As ilustrações deverão ser organizadas de modo a permitir sua reprodução dentro da mancha da revista (22 x 12,5cm).
   (22 x 12,5cm).
6. Os artigos deverão conter no máximo 6 (seis) ilustrações (branco e preto). De cada trabalho serão impressas 50 (cinqüenta) separatas, sendo 10 para a Biblioteca do Instituto e 40 para os autores.
7. Os textos originais não serão devolvidos e os originais das ilustrações estarão à disposição dos autores.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. Manuscripts submitted to the Editorial Board should be unpublished texts and should not be under consideration for publication elsewhere. Reproduction for commercial purposes is not allowed. The Editorial Board will plan the publication of revision articles.
2. The original and two copies of papers should be typewritten in Portuguese, English or French, double spaced, on typing paper (31 x 21cm). Pages should be numbered consecutively at the upper right corner.
3. The following structure should be considered in the preparation of the manuscript: **Title page:** with article title, name of author(s), professional address. **Text:** with introduction, material and methods, results, discussion, conclusions, acknowledgments, references, summary (in Portuguese and English), and key-words. A maximal number of 03 key-words should be included in Portuguese and English.
4. References in alphabetical order should be numbered consecutively.
   Examples:
   Books
   7. BIER, O. Microbiologia e imunologia. 24.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Articles
   8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA F.º, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan, 40/41:** 1-9, 1976/77.
   Citations in the text should be identified by the reference number.
   Examples:
   ... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ... segundo vários autores[2,3,4]
5. Illustrations (photographs, tables, figures etc.) should be the originals and legends should be submitted typewritten on a separate sheet. Line-drawings should be with China ink and photographs must be of top quality. On the back of each figure or photograph the name of the author(s) should be lighly written and the number indicating the sequence in the text. Illustrations should fit in a page measuring 22 x 12,5cm.
6. No more than 6 illustrations will be accepted and photographs should be black and white. Fifty reprints of each article are provided without charge, and 10 will be kept at the library.
7. Submitted manuscripts will not be returned to the author(s) but the original illustrations are available to author(s) by request.